

INFLUENCE
DE LA
COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AIR
SUR LE
DEVELOPPEMENT DES CULTURES
DE MOISSURES
(Cas de l'*Aspergillus Niger*)

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Novembre 1933
PAR

Jean BOUSQUET

Licencié ès Sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Lauréat de la Faculté de Paris

JURY } MM. TASSILLY, *Président.*
SOMMELET, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

LES ÉDITIONS VÉGA
43, Rue Madame, 43
PARIS
1933

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933 - 1934

N° 26

INFLUENCE
DE LA
COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AIR
SUR LE
DEVELOPPEMENT DES CULTURES
DE MOISSURES
(Cas de l'*Aspergillus Niger*)

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Novembre 1933
PAR

Jean BOUSQUET

Licencié ès Sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Lauréat de la Faculté de Paris

JURY } MM. TASSILLY, *Président.*
SOMMELET, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

LES ÉDITIONS VÉGA
43, Rue Madame, 43
PARIS
1933

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, *Doyen*, *, * I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, * I.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, *, * I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, *, * I. Botanique générale.
 BEHAL, Membre de l'Institut, G.O. *, * I. Chimie organique.
 PERROT, O. *, * I. Histoire naturelle des médicaments.
 COUTIERE, O. *, * I. Zoologie.
 LEBEAU, O. *, * I. Pharmacie chimique.
 BOUGAULT, *, * I. Chimie analytique.
 GORIS, *, * I. Pharmacie galénique.
 TASSILLY, O. *, * I. Physique.
 DAMIENS, *, * I. Chimie minérale.
 HERISSEY, O. *, * I. Chimie biologique.
 SOMMELET, *, * I. Hydrologie et Hygiène.
 LUTZ, *, * I. Cryptogamie et Microbiologie.
 FABRE, * I. Toxicologie.
 LAUNOY, O. *, * I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, * I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. *, * I. et GUERBET, *, * I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, * I. . Législation et Déontologie pharmaceutiques.
 LAUNOY, O. *, * I. Pharmacodynamie.
 DELABY, *, * I. Minéralogie.
 PICON, * I. Chimie minérale.
 BACH, * I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, * A.
 PICON, * I.
 MASCRE, * I.
 FLEURY, * I.

MM. BACH, * I.
 BEDEL, * I.
 REGNIER, * I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, * I., *agrégé*, chargé des T. P. de 1^{re} année. Chimie générale.
 FLEURY, * I. et REGNIER, * I. : *agrégés*,
 chargés des travaux de Chimie analytique.
 SOUEGES, * I. Micrographie.
 LEROUX, * I. Physique.
 DEVAL, *, * I. Microbiologie.
 DELABY, *, * I., PICON, * I. et MASCRE, * I. :
agrégés, chargés des travaux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, * I.



A MON PERE

A MA MERE

A MA SŒUR

A MES AMIS

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur TASSILLY

A mes maîtres dans les Hôpitaux

Monsieur le Professeur HÉRISSEY

Monsieur le Professeur SOMMELET

A Monsieur le Professeur TRILLAT,

de l'Institut Pasteur

AVANT - PROPOS

C'est pour nous un devoir, après quatre années passées dans les hôpitaux, que de remercier ceux qui nous ont aidé et de leur bienveillance et de leurs conseils. Il nous est agréable de nous en acquitter et de dédier cette thèse à ceux qui, par leur enseignement, nous ont permis de mener à bien nos études pharmaceutiques.

M. le Professeur Tassilly, en nous accueillant dans son laboratoire et en acceptant de présider cette thèse, nous a fait un très grand honneur et nous lui adressons nos bien vifs remerciements pour sa bienveillance et l'intérêt qu'il a pris à notre travail.

Que nos maîtres d'Internat, MM. les Professeurs Sommelet et Hérissé, reçoivent ce témoignage de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement. Nous avons reçu d'eux, pendant notre séjour à l'Hôpital Cochin et à l'Hôpital Saint-Antoine, un appui et des directives éclairés pour l'accomplissement de nos fonctions.

Nous ne saurions également trop remercier M. Bach, Pharmacien chef de l'Hôpital Tenon, qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Trillat, Chef du Service des Recherches appliquées à l'hygiène à l'Institut Pasteur, et dont tout le monde connaît les intéressantes recherches sur les propriétés de l'aldéhyde formique et leurs nombreuses applications pratiques, nous exprimons notre profonde reconnaissance pour nous avoir permis de mener à bien ce travail en s'ouvrant à nous de ses idées et en nous aidant de ses conseils.

INTRODUCTION

Les agents chimiques désignés sous le nom d'antiseptiques, ayant une action sur le ralentissement ou sur l'arrêt de la vie des microorganismes sont très nombreux. Dès l'apparition des théories pasteurienues, de nombreux savants se sont occupés de déterminer la valeur antiseptique comparée de ces divers produits, non seulement au point de vue du pouvoir infertilisant, c'est-à-dire des quantités d'antiseptiques nécessaires pour rendre infertile un poids donné de terrain de culture, mais aussi au point de vue des doses microbicides, nécessaires pour tuer, après un temps déterminé, les germes contenus dans un bouillon de culture en voie d'évolution.

C'est ainsi qu'on trouve dans la littérature de nombreux travaux sur la valeur comparative des antiseptiques au point de vue de l'infertilisation et du pouvoir microbicide vis-à-vis des principaux germes connus. Les résultats obtenus d'auteurs à auteurs sont généralement concordants.

On ne s'est pas borné à étudier l'action des antiseptiques en solution dans le bouillon de culture ; plusieurs auteurs se sont attachés à la détermination de l'action des antiseptiques à l'état de vapeurs. Mais dans ce cas, les méthodes suivies par les bactériologues étaient loin de présenter la technique rigoureuse des essais ayant pour but de déterminer le pouvoir antiseptique en solution.

Le fait saillant qui ressort de l'ensemble des expériences de ces auteurs est que les antiseptiques semblent être, d'une façon générale, plus actifs à l'état de vapeurs qu'à l'état de solution.

Si l'on fixe son attention sur les expériences qui ont été faites sur l'action antiseptique à l'état de vapeurs, on se rend compte combien cette étude est incomplète et laisse des points obscurs. De prime abord l'on peut, en effet, supposer que cette action dépend de la surface du terrain de culture, de son épaisseur, du volume d'air, de l'introduction de l'antiseptique gazeux à doses massives ou à faibles doses discontinues, de sa rapidité de diffusion, et surtout de la nature de l'antiseptique employé.

Si l'on voulait se rendre compte de l'influence de tous ces facteurs, une pareille étude demanderait un temps considérable.

Le travail que nous avons fait, et qui a nécessité un grand nombre d'expériences, a pour objet de préciser quelques points et notamment d'établir la comparaison de l'action des vapeurs antiseptiques sur un terrain de culture, par rapport aux mêmes doses antiseptiques ajoutées directement dans le milieu de culture, études comparatives qui, à notre connaissance, n'ont jamais été faites.

*
**

Mais ce ne sont pas seulement les antiseptiques à l'état gazeux qui peuvent agir sur des germes renfermés dans un milieu de culture quelconque. De nombreux travaux exécutés ces dernières années ont montré que dans certaines conditions, les bactéries subissaient aussi l'action opposée à la précédente, c'est-à-dire une action favorisante, lorsque l'air ambiant renfermait certaines substances volatiles jouant le rôle d'aliments gazeux.

Là encore il était utile de se rendre compte de l'action de ces aliments gazeux répandus dans l'air par rapport aux mêmes proportions de corps introduits dans le terrain de culture.

C'est pourquoi cette étude de l'action favorisante de certaines substances a été menée parallèlement à l'étude des antiseptiques.

*
**

Avant d'aller plus loin, étant données les considérations précédentes qu'il était nécessaire d'exposer, on peut se demander maintenant quel est le but et l'importance de cette étude qui peut être envisagée comme point de départ de nouveaux travaux de plus grande envergure.

De récents travaux exécutés ces dernières années ont montré que la composition chimique de l'air exerçait une influence considérable sur les microbes en suspension dans l'air ou sur les terrains ou supports microbiens. Selon les traces d'impuretés gazeuses répandues dans l'air, à des doses infinitésimales à peine décelables par les réactifs, on a pu constater que cet air agissait tantôt comme agent de ralentissement des cultures, tantôt comme agent favorisant la multiplication des germes, la vitalité des germes renfermés dans un bouillon de culture liquide ou solide dépendant essentiellement de la composition de l'air.

Nous nous trouvons donc ici dans des conditions très voisines de celles que nous nous sommes proposés d'examiner en petit au laboratoire, et ces conditions se présentant dans la pratique courante, on saisit facilement l'intérêt de ces essais.

Sans être taxé d'exagération, on peut supposer qu'un grand nombre de phénomènes vitaux doivent être influencés par la composition chimique de l'air, qui renferme toujours des substances gazeuses, tantôt antiseptiques, tantôt favorisantes.

*
**

Etant donnée la complexité de cette étude, il s'agissait de s'adresser à un cas concret et de trouver un mode opératoire permettant d'aborder la question sous un angle limité, mais suffisamment net pour donner quelques précisions sur le sujet.

Dans ce but, nous nous sommes adressés à l'*Asper-*

gillus niger, VAN TIEGHEM 1867, comme micoorganisme et au liquide de RAULIN comme milieu de culture.

Nous pensons que ce choix convient pour deux raisons :

D'abord l'*Aspergillus* est très sensible à la présence des moindres traces d'antiseptiques, comme l'a prouvé RAULIN ; nous avons pensé qu'il en serait de même pour des agents favorisants et nous verrons plus loin qu'il en est ainsi ;

D'autre part, il est extrêmement facile d'évaluer les cultures d'*Aspergillus* en pesant directement les voiles formés.

Dans son ouvrage, intitulé *Etudes chimiques sur la végétation*, RAULIN (1) montra qu'un végétal (en l'espèce l'*Aspergillus niger*) peut se développer dans des milieux artificiels exclusivement formés de composés chimiques définis. Il précisa les conditions les plus favorables à la production du végétal, chercha quels sont les éléments physiques ou chimiques qui influent sur son développement, et mesura numériquement les effets de chacun d'eux. Des résultats obtenus, il dégagera les conséquences générales qui furent à la base de toute une série de travaux français et étrangers.

Au cours de leurs expériences, les divers auteurs modifièrent le milieu type de culture, en créant de nouveaux milieux ne différant du premier que par la ou les circonstances physiques ou chimiques qu'ils se proposaient d'étudier, et notèrent leur influence sur le développement du végétal.

Parmi les éléments, il en est un dont la présence fut reconnue indispensable par RAULIN, c'est l'oxygène. Nous avons cherché à modifier la composition chimique de l'air dont l'*Aspergillus* a besoin pour vivre, en l'additionnant, soit de substances susceptibles de gêner ou d'empêcher son développement, soit de substances pouvant, au contraire, favoriser sa croissance.

C'est en pesant les cultures formées, et en comparant les résultats, que nous avons pu étudier à la fois l'influence antiseptique et favorisante de l'air, dont on fait varier la composition chimique.

Il fallait, d'autre part, faire un choix parmi les corps à essayer. Nous avons choisi pour les antiseptiques le formol, que l'on peut utiliser à l'état liquide ou gazeux et quelques autres produits parmi lesquels des essences aromatiques. Comme produits favorisants, nous avons expérimenté l'ammoniaque, l'acétate d'ammoniaque, quelques amines et des gaz azotés provenant de la putréfaction de la matière organique sous une action microbienne.

**

Comme suite à ce qui vient d'être exposé, ce travail est divisé en deux parties, comportant chacune des subdivisions que nous exposerons dans l'ordre suivant :

PREMIÈRE PARTIE

A. — *Action du formol :*

- a) Choix et historique de l'antiseptique.
- b) Mode opératoire.
- c) Limites d'erreurs des expériences.
- d) Essais préliminaires.
- e) Expériences.
- f) Conclusions.

B. — *Etudes d'autres antiseptiques :*

- a) Chloroforme.
- b) Essences aromatiques.

C. — *Applications :* conservation de produits fermentescibles par les vapeurs de formol.

- a) Bouillon de culture.
- b) Lait.

D. — *Etude du mécanisme de l'action de l'air formolé antiseptique* sur les cultures.

DEUXIÈME PARTIE

Introduction.

A. — *Essais sur l'ammoniaque :*

- a) Cultures sur liquide de RAULIN :
 - 1° Cristallisoirs.
 - 2° Flacons.

b) Cultures sur un milieu privé d'azote.

3° Cristallisoirs.

c) Conclusions.

B. — *Acétate d'ammoniaque*, acide acétique. Amines.

C. — *Gaz de la décomposition organique*.

Historique.

Expériences.

D. — *Résumé des essais* :

Conclusions générales.

■

PREMIERE PARTIE

A. — *Action du formol*

a) *Historique des propriétés antiseptiques des vapeurs de formol.*

Avant d'exposer nos essais, nous avons cru utile de rappeler en quelques pages les principaux travaux qui ont été faits sur les propriétés antiseptiques des vapeurs de formol, notamment ceux qui semblent se rapprocher de l'objet de notre étude.

Les propriétés antiseptiques du formol ont été remarquablement mises en lumière, voici une quarantaine d'années, surtout par les travaux de M. TRILLAT qui en a tiré de nombreuses applications, et ont fait depuis cette époque l'objet de nombreuses études.

Déjà, en 1888, LOEW (2) avait signalé son intérêt physiologique par son action sur les albumines, les enzymes et le protoplasme vivant. Il constata qu'une solution de formaldéhyde à 0,1 0/00 tue des Algues (*Spirogyra*) en douze heures, que des Schizomycètes ne peuvent se développer dans une solution nutritive renfermant 0,1 0/00 de cette aldéhyde. Il nota enfin son action toxique sur de petits animaux : des cloportes, des vers et des mollusques meurent entre une et deux heures, quand l'eau est additionnée de 0,5 0/00 de formol ; à cette concentration, seules certaines larves d'insectes peuvent résister durant quelques jours.

L'année suivante BÜCHNER et LEGALL (3), après avoir rappelé qu'il était un poison cellulaire général, étudient l'action du formol sur le staphylocoque, le bacillus prodigiosus, le colibacille, le pyocyanique, le vibron cholérique et montrent qu'elle est surtout sensible

sur le pneumobacille de Friedländer, le bacille typhique et le Protéus. Ils notent déjà que l'action antiseptique des vapeurs de formol doit retenir l'attention.

En 1892, M. TRILLAT (4) étudia l'action antiseptique de la solution de formaldéhyde sur la conservation du bouillon (une dose de 1 pour 12.000 suffit à empêcher l'altération pendant plusieurs semaines), sur les bacilles de la salive, les eaux d'égouts, et signala son action antifermentescible sur le lait, et à des doses très faibles.

En 1891, dans un procédé d'application des propriétés antiseptiques des vapeurs de formol, M. TRILLAT avait spécifié que la désinfection pouvait être obtenue par l'emploi de ce corps, soit à l'état solide, soit à l'état liquide, soit à l'état gazeux.

Il établit ensuite, en collaboration avec le docteur BERLIOZ (5), l'action antiseptique et microbicide des vapeurs de formol sur les bacilles salivaires, les bacilles de la décomposition, le bacillus anthracis, le bacille d'Eberth, le colibacille. Enfin il démontra (*Moniteur scientifique*, 1892) que le voisinage d'un linge imbibé d'une faible solution de formol est capable d'arrêter la putréfaction de la viande et décrivit plus tard un procédé de désinfection basé sur cette propriété.

a) Pour étudier l'action antiseptique des vapeurs de formol (6), l'on plaçait sous une cloche de 10 litres divers milieux de culture stérilisés,ensemencés par les microorganismes du jus de viande en décomposition, et l'on disposait un récipient renfermant 5 centimètres cubes de formol à 10 %. Cela suffit pour empêcher le développement des bactéries.

L'action est la même avec l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium*.

b) Pour examiner l'action bactéricide des vapeurs, des morceaux de toile de un centimètre carré, imbibés d'une culture de bacilles, étaient suspendus dans un flacon dans lequel on faisait passer un courant d'air ayant préalablement traversé une solution de formol à 5 %. Toutes les cinq minutes, on retirait un morceau de toile et on le transportait dans du bouillon placé à l'étuve.

Deux ans plus tard VAN ERMINGEN et SUGG (7) re-

prennent ces expériences ; ils utilisent un liquide vendu sous le nom de formaline, qui serait une solution aqueuse à 40 % de formol, et font des expériences sous cloche, des essais en grand et des expériences en présence de la chaleur.

Pour les expériences sous cloche, ils se servaient de fils imprégnés de microorganismes, ou de bandelettes de papier sur lesquelles on avait laissé dessécher des cultures sur agar. Chaque fil était lavé dans plusieurs vases contenant de l'eau stérilisée, pour les débarrasser de la substance désinfectante dont ils étaient imbibés.

Ces deux auteurs opéraient sur des espèces de microorganismes pathogènes intéressant surtout l'hygiène ; ils étaient exposés au contact d'une atmosphère à peu près saturée de vapeurs d'aldéhyde formique se dégageant de sa solution aqueuse. Ils en conclurent qu'elle exerce une action très énergique sur la vitalité des microorganismes.

Vers la même époque, M. TRILLAT (8), donne les résultats d'expériences comparatives entre le pouvoir antiseptique du formol en solution et celui de ses vapeurs.

« A l'état de vapeurs, le formol agit incomparablement d'une manière plus sûre et plus rapide, tuant sans rémission les bactéries et les germes soumis à son action. J'ajouterai que les doses en poids de formol, nécessaires pour obtenir ce résultat, deviennent très faibles par rapport aux doses microbicides. J'ai établi par un grand nombre d'expériences ce pouvoir microbicide des vapeurs de formol, et toutes ont donné des résultats positifs. D'une manière générale on peut affirmer qu'aucune bactérie et aucun germe ne résiste dans une atmosphère qui ne contient pour ainsi dire que des traces impondérables de vapeurs de formol. »

En ce qui concerne le *Penicillium* et l'*Aspergillus niger*, tandis que le formol en solution infertilise le liquide de RAULIN à la concentration de 1 pour 10.000, les liquidesensemencés par ces germes resteraient clairs lorsque l'air ambiant renferme 1 pour 20.000 de formol.

Près de quinze ans plus tard, un auteur italien, G. TRABOSCHI (9), étudiant de nouveau l'action des vapeurs

de formol, signale que « leur diffusion à travers un bouchon d'ouate, par exemple, est très lente. Il en résulte que lorsque les vapeurs ne sont pas immédiatement mises en contact avec les microbes à détruire, la disparition de ceux-ci n'a lieu qu'avec un grand retard. Le même fait s'observe naturellement avec des moisissures (*Aspergillus*) ».

En 1918, F.-G. GUSTAFSON (10), dans ses *Etudes comparatives sur la respiration*, étudia l'effet des anesthésiques et d'autres substances sur la respiration d'un champignon. Dans ses recherches, il s'adressa à l'*Aspergillus niger*, en raison de sa croissance facile dans une solution nutritive, de l'abondance des récoltes et de la sécurité que présentent, en vue d'expériences comparatives, les règles classiques de sa culture. Parmi les substances mises en œuvre dans ses expériences (éther, acétone, alcaloïdes), le formol seul présente pour nous quelque intérêt.

La concentration en formol de 0,2 % (en volume) ne donnant que de faibles changements, l'auteur utilise celle de 0,4 % qui provoque d'abord un accroissement notable du taux de respiration par rapport aux témoins, suivi d'une diminution brusque.

Remarquons que l'auteur ne s'occupe que de la respiration de la Mucédinée, sans s'inquiéter de l'influence du formol sur les poids de culture obtenus.

Enfin, assez récemment, un auteur de Prague, BERNHAUER (11), étudiant l'action d'ions métalliques divers et d'éléments organiques toxiques sur l'acidification du milieu de culture par l'*Aspergillus*, utilise des solutions au millième de formaldéhyde, d'alcool méthylique, de chloroforme, etc... Il constate que parmi ces éléments, seul le formol a une action empêchante sur l'acidification.

b) Mode opératoire :

Nous avons suivi, autant que possible, les règles classiques de culture de l'*Aspergillus niger*, en ne nous en écartant que dans la mesure où les expériences nous obligeaient à le faire.

Le milieu de culture utilisé est le milieu-type de RAULIN, dont nous rappelons ci-dessous la composition :

Eau distillée	1.500 grammes
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0,60 —
Carbonate de potassium	0,60 —
Carbonate de magnésie	0,40 —
Sulfate d'ammoniaque	0,25 —
Sulfate de zinc	0,07 —
Sulfate ferreux	0,07 —
Silicate de potassium	0,07 —

Quand on a réussi à composer un pareil milieu, voici — d'après l'auteur — la marche à suivre pour étudier l'influence de diverses circonstances physiques ou chimiques sur le développement du végétal :

On dispose un vase rempli du milieu artificiel dans les conditions les plus favorables pour la végétation, on y sème des germes du végétal, qu'on laisse croître pendant le temps nécessaire ; cet essai, qu'on reproduit identiquement dans chaque série d'expériences, est l'essai-type.

Parallèlement à ce premier essai, on en dispose un second qui ne diffère du premier que par la seule circonstance qu'on se propose d'étudier. On pèse séparément à l'état sec les deux récoltes obtenues dans le même temps. Le rapport numérique du poids de ces deux récoltes mesure l'influence de la circonstance dont il s'agit.

Ensemencement :

L'ensemencement se fait fréquemment en promenant sur toute l'étendue du liquide l'extrémité d'un pinceau avec lequel on a recueilli des spores sur une végétation d'*Aspergillus* bien pure.

Nous avons préféré, pour nous placer dans des conditions toujours identiques, nous servir d'une émulsion de spores, dont on prélève une certaine quantité, la même pour chacun des différents récipients d'une expérience déterminée. Pour préparer cette émulsion il suffit d'agiter fortement pendant quelques minutes une parcelle de culture mûre avec quelques centimètres cubes d'eau distillée dans un tube à essais stérile, de laisser reposer pour permettre aux fragments de mycélium de se rassembler à la surface, ensuite de prélever de cette émulsion avec une pipette effilée et d'en répartir un même nombre de gouttes dans chacun des récipients à ensemercer.

Ceux-ci sont alors placés dans une étuve réglée à 35°, la température du milieu de culture, qui est d'environ 34°, étant reconnue comme la plus favorable au développement de la végétation.

Les cultures se développent au bout de dix-huit à vingt-quatre heures ; après quarante-huit heures, elles forment une membrane épaisse, d'abord blanche, qui se couvre de fructifications et est complètement noire à sa face supérieure après trois jours.

La végétation fait des progrès continuels pendant quatre jours au moins ; mais les poids moyens, formés en vingt-quatre heures étant à peu près égaux dans les deuxième et troisième jours, et plus forts que dans le premier et le quatrième, il faut faire les récoltes après deux ou trois jours de végétation.

C'est ce qui a été fait ici dans la majorité des cas ; dans quelques-uns seulement, l'expérience a été prolongée quelques jours de plus pour en mieux observer les résultats.

Pour récolter, il suffit d'enlever avec les doigts la membrane formée, de la presser fortement pour en exprimer la plus grande partie du liquide qui l'imprègne, et de la faire sécher à l'étuve ; il ne reste plus qu'à la peser.

Récipients utilisés :

L'on utilise en général des cuvettes de porcelaine rectangulaires, peu profondes, placées non couvertes dans l'étuve.

RAULIN a montré, en effet, que :

1° Le développement est plus rapide dans un vase découvert que dans un vase couvert ;

2° Il est d'autant plus rapide que le vase est moins profond ;

3° Il est d'autant plus rapide que le rapport du périmètre de la surface du liquide à la surface est plus grand.

Ces divers effets de la forme des vases sont en relation directe avec l'intervention nécessaire de l'oxygène de l'air.

De tels récipients conviennent lorsqu'il ne s'agit que de modifier le milieu de culture sans s'inquiéter de l'air ambiant. RAULIN indique simplement que « la pureté de l'air ne doit être troublée ni par les gaz des laboratoires, ni par d'autres émanations, car les Mucédinées sont très sensibles à certaines influences délétères. »

Mais, dans le but que nous poursuivions, il n'était pas possible de les utiliser ; il fallut opérer dans des vases *clos*, pour que la substance volatile introduite dans l'air environnant les cultures, dans le but d'en modifier la composition, ne puisse s'échapper.

Il est certain que de cette façon, la végétation croît dans des conditions différentes de la normale, et cela pour plusieurs raisons : d'abord le manque d'oxygène, lorsque la plante a épuisé celui de l'air contenu dans les récipients où elle croît, ensuite les produits de la respiration (notamment le gaz carbonique) ne peuvent s'éliminer comme dans une étuve où l'air est renouvelé ; en outre, l'état hygroscopique de l'air renfermé dans le vase atteint rapidement la saturation.

En général, du reste, en opérant dans des vases *clos*, les cultures ont de la difficulté à former leurs fructifications (qui n'apparaissent guère avant le troisième ou le quatrième jour), parfois même, elles restent tout à fait blanches.

Mais comme dans toutes nos expériences les résultats ont été observés comparativement à des témoins placés dans les mêmes conditions, les causes d'erreur provenant de ce fait ne sont plus valables.

Nos premiers essais ont été faits dans des flacons d'une contenance de 300 centimètres cubes, à col étroit, bouchés, mais n'ont pas donné de résultats. Ceci était dû à la forme impropre des récipients, et au manque d'oxygène, les témoins eux-mêmes ne poussant pas ou ne donnant que des cultures insignifiantes.

Nous avons obtenu une croissance normale des cultures en utilisant les deux sortes de vases suivants :

D'une part des cristallisoirs en verre blanc, d'une contenance de 200 à 250 centimètres cubes, d'un diamètre de 8 centimètres et d'une profondeur de 5 centimètres, dont les bords rodés permettent de les fermer au moyen de plaques de verre, le joint étant au besoin parfait avec un peu de vaseline ;

D'autre part, des flacons d'une capacité de un litre, d'une largeur de 9 à 10 centimètres, à larges goulots, que l'on fermait avec des bouchons de liège.

Distribution des réactifs utilisés :

Pour étudier l'influence d'un corps déterminé, il suffit de l'ajouter directement en proportions convenables au milieu de culture.

Mais, quand il s'agissait d'étudier l'effet de ses vapeurs, le composé plus ou moins volatil utilisé fut réparti sur des tampons de coton hydrophile suspendus au-dessus de la surface du liquideensemencé au moyen de fils fixés aux bouchons.

Quand on employait des cristallisoirs, les fils étaient fixés aux plaques de verre au moyen de cire, ou mieux l'on fixait directement les cotons sur les plaques avec de la vaseline ; l'adhérence obtenue est suffisante.

c) Limites d'erreur de nos expériences :

Nous nous sommes demandés quel était l'ordre de grandeur des erreurs que nous pourrions commettre.

Celles-ci peuvent avoir deux origines :

1° Celles relatives à toutes les expériences mettant en jeu des phénomènes biologiques et indépendantes de l'expérimentateur.

Elles sont cause d'un certain pourcentage de résultats qui semblent contradictoires avec ceux de la majorité des autres expériences, mais en tirant les conclusions générales de l'ensemble des résultats obtenus sur de nombreux essais faits dans des conditions identiques, elles deviennent négligeables.

2° Celles provenant du mode opératoire adopté au cours de nos expériences.

Nous avons été obligés, en effet, devant faire croître les cultures dans des vases clos, d'opérer dans des conditions différentes de celles d'usage habituel.

Mais, comme nous avons dans chaque expérience, disposé à côté des essais, un ou plusieurs témoins poussant de façon identique, les résultats étant finalement comparés à ceux de ces témoins, sont valables, cette cause d'erreur étant la même dans tous les cas.

d) *Essais préliminaires :*

Quelques expériences préliminaires étaient nécessaires pour déterminer les conditions optima qu'il fallait réaliser pour obtenir de bonnes cultures. Voici ces essais :

1° Nous fîmes d'abord l'expérience suivante, afin de savoir si l'utilisation de récipients clos ne gênait pas la croissance de l'*Aspergillus niger* :

Six cristallisoirs contenant 30 centimètres cubes de liquide de RAULIN (couche de 1 centimètre environ) étaientensemencés chacun avec vingt gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Les récipients 1 et 2 étaient couverts de plaques de verre les fermant complètement ; sur 3 et 4 on disposait des plaques semblables, en laissant un intervalle d'un millimètre entre elles et le bord supérieur ; il en était de même pour les récipients 5 et 6, l'intervalle laissé étant de 2 à 3 millimètres. Les cristallisoirs ensemencés furent portés à l'étuve.

Deux jours après, tous présentaient de belles cultu-

res, blanches dans les deux premiers, brunes dans les autres ; dans les heures suivantes, le témoin 1 se couvrit de fructifications, tandis que 2 brunit à peine. Recueillies le troisième jour et mises à sécher, elles donnèrent à l'état sec les poids suivants :

1	2	3	4	5	6
0 gr. 553	0,312	0,537	0,549	0,549	0,551

L'on voit, d'après les poids obtenus, que si l'une des cultures en vase clos a donné le même poids que ceux des cultures faites dans des vases communiquant avec l'air libre de l'étuve, l'autre, par contre, donna une culture nettement inférieure et ses fructifications se formèrent mal.

2° Pour déterminer la quantité de liquide de RAULIN à mettre en œuvre dans nos expériences, nous fîmes l'essai suivant :

Des cristallisoirs renferment des quantités différentes du liquide de culture furent ensemencés comme précédemment. Tous furent fermés au moyen de plaques de verre et portés à l'étuve.

Le premier reçut 200 centimètres cubes de liquide (dont le niveau atteignait presque les bords du vase), le deuxième 150 centimètres cubes, le troisième 100 centimètres cubes et le dernier 50 centimètres cubes.

Les cultures furent recueillies après trois jours.

Voici leurs poids à l'état sec :

1	2	3	4
1 gr. 835	1,890	1,735	1,212

La dernière culture nettement inférieure mise à part, les autres ont donné des poids sensiblement analogues.

Au cours de nos expériences, nous avons généralement adopté un volume de 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN, la hauteur de celui-ci dans les réipients étant comprise entre deux et trois centimètres, et le volume d'air le surmontant (dans les cristallisoirs) étant à peu de chose près égal.

3° Détermination de la quantité de spores convenables pour l'ensemencement :

Des cristallisoirs renfermant le même volume de liquide de RAULIN furent ensemencés respectivement avec

II, V, X et XX gouttes d'une émulsion de spores préparée comme il a été indiqué.

Les poids secs des cultures, recueillies au bout de deux jours, furent respectivement de :

0 gr. 458	0,461	0,453	0,401
-----------	-------	-------	-------

Les différences sont peu sensibles.

Nous avons adopté le nombre de X gouttes de l'émulsion de spores pour les expériences faites dans les cristallisoirs, et celui de XX quand nous nous sommes servis de flacons.

4° Nous citons ici un essai effectué au cours d'expériences faites dans des flacons, ceux-ci semblant présenter parfois des irrégularités au cours de la croissance des cultures, suivant la place qu'ils occupaient dans l'étuve.

Un certain nombre de flacons, contenant 100 centimètres cubes de liquide, furent ensemencés, bouchés et portés à l'étuve. Les cultures recueillies au bout de deux jours et séchées, donnèrent les poids suivants :

0,580	0,715	0,650
0,690	0,700	0,647
0,651	0,687	0,656

Les cultures obtenues, la première mise à part, sont comprises entre 0 gr. 650 et 0 gr. 715. La disposition des vases a donc peu d'influence sur la marche de la végétation. En pratique, nous avons rassemblé les récipients les uns auprès des autres, afin d'éviter le contact de l'un ou de plusieurs d'entre eux avec les tubes de l'étuve, une légère différence de température pouvant être une cause d'erreur suffisante pour fausser les résultats.

5° Nous avons ensemencé des cristallisoirs renfermant :

Le premier 50 centimètres cubes de liquide de RAULIN ;

Le deuxième 50 centimètres cubes de ce liquide dilué de son volume d'eau distillée ;

Le troisième 50 centimètres cubes de liquide dilué des deux tiers d'eau distillée.

Les cultures recueillies le troisième jour, donnèrent respectivement les poids suivants :

0,735	0,410	0,226
-------	-------	-------

La dilution influe donc sensiblement sur la croissance des cultures.

Dans les expériences qui vont suivre, relatives au formol, nous avons employé généralement du liquide de Raulin étendu de son volume d'eau. La plante ne se trouve plus ainsi dans les conditions les plus favorables à la croissance et doit être plus sensible aux diverses circonstances que l'on étudie.

Nous verrons, du reste, que d'autres expériences, répétées, dans les mêmes conditions, en employant du liquide de RAULIN non dilué, ont donné des résultats identiques.

e) *Expériences personnelles :*

Les expériences ayant pour but l'étude de l'influence de la solution et des vapeurs de formol sur la croissance de l'*Aspergillus niger*, sont classées pour faciliter leur exposé, en trois séries, suivant les récipients et les conditions dans lesquelles elles furent réalisées.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Les vases utilisés sont des flacons d'un litre, à fond plat, à large ouverture, fermés au moyen de bouchons de liège.

Expérience 1 :

Trois flacons, contenant chacun 50 centimètres cubes de liquide de RAULIN sontensemencés avec XX gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Le premier sert de témoin.

Le deuxième est additionné de X gouttes d'une solution de formol à 10 % (préparée avec 10 centimètres cubes de solution de formol du commerce et 90 centimètres cubes d'eau distillée).

Le bouchon du troisième supporte un fil qui maintient un tampon de coton hydrophile ; sur celui-ci l'on répartit X gouttes de formol à 10 %.

Les flaconsensemencés et bouchés sont portés à l'étuve.

Le lendemain, le témoin seul présente une culture qui alla en croissant les jours suivants. Les autres ne pré-

sentent pas de trace de culture et il en fut de même par la suite.

Pour distribuer le formol, nous utilisions une pipette d'un centimètre cube, donnant XXV gouttes de solution de formol au dixième par centimètre cube.

La concentration du flacon 2 est facile à calculer :

$$\begin{array}{ccccccc} 10 & 1 & 1 & 1 & & & \\ 1 \times \frac{1}{25} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{50} \times \frac{1}{1250} & \text{en formol commercial à } 40 \% \\ & & & 1 & & & \\ & & & \text{ou } \frac{1}{3125} & \text{en formol pur} \end{array}$$

Cette concentration empêche donc totalement la croissance de l'*Aspergillus*.

Expérience 2 :

La même expérience fut refaite en utilisant une solution de formol à 1 %, donnant XXIV gouttes au centimètre cube.

Le premier flacon servait de témoin.

Le deuxième recevait X gouttes de solution de formol à 1 %.

Dans le troisième, la même dose était versée sur un tampon de coton.

Les flacons portés à l'étuve donnèrent tous trois des cultures qui, recueillies le troisième jour, et séchées, donnèrent les poids suivants :

Témoin	1 gr. 213
1	0 gr. 970
2	0 gr. 864

La concentration est de :

$$\begin{array}{ccccccc} 1 & 1 & 1 & 1 & & & \\ 10 \times \frac{1}{24} \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{50} \times \frac{1}{12.000} & \text{en formol commercial} \\ & & & 1 & & & \\ & & & \text{ou } \frac{1}{30.000} & \text{en formol pur} \end{array}$$

Pour cette faible concentration, nous observons déjà une diminution du poids des récoltes.

Expérience 3 :

Elle fut conduite de la même manière, en prenant une dose de formol intermédiaire, soit V gouttes de formol à 10 %. Le lendemain de l'ensemencement, le té-

moins seul présentait une culture ; le surlendemain de même ; le troisième jour seulement, les autres cultures commencèrent à pousser ; la récolte fut faite le quatrième jour.

Témoin	1 gr. 208
1	0 gr. 475
2	0 gr. 707

Les expériences suivantes donnèrent des résultats semblables. Les volumes de liquide de RAULIN ensemencés furent généralement de 100 centimètres cubes, et les doses de formol restèrent comprises dans les limites qui viennent d'être indiquées.

Elles sont exposées dans le tableau ci-contre, dans l'ordre dans lequel elles furent faites.

Dans la première colonne figurent les numéros d'ordre, dans la suivante est indiquée la durée des expériences (en jours). Pour chacune de celles-ci l'on trouvera le poids de la culture témoin, celui de la culture ayant subi l'action d'une quantité déterminée de solution de formol et celui de la culture soumise aux vapeurs émises par la même dose répartie dans l'air voisin.

Ces deux derniers tableaux ont été séparés pour mieux pouvoir les comparer.

Si l'on examine le tableau ci-contre, il est facile d'en dégager les faits suivants :

1° D'une manière générale, sauf quelques cas particuliers relatifs aux premières expériences et sur lesquels nous reviendrons tout à l'heure, aux doses utilisées, le formol retarde la croissance des cultures d'*Aspergillus niger*.

Cette action antiseptique fut d'ailleurs facile à constater *de visu*. En effet, le lendemain de l'ensemencement, les témoins avaient toujours poussé, présentant déjà un voile sur toute la surface du liquide de culture. Au bout du même laps de temps, les flacons contenant du formol ne poussaient pas encore ou ne montraient que des traces de cultures ; ce n'est que le deuxième jour que l'on pouvait voir des voiles, s'accroissant dans les jours suivants.

N ^{os}	Durée	Témoins	Formol à 10 % (gouttes)									
			dans le liquide					dans l'air				
			IV	V	VI	VII	X	IV	V	VI	VII	X
1		"					0					0
2	4	fer, 208		0,475					0,707			
3	4	1,060			0,700					0,366		
4	4	0,685			0,682					0,950		
5	3	0,797			0,856					0,631		
6	4	1,247			4,439					4,120		
7	3	1,034		0,956					0,580			
8	3	0,896				0,385					0,293	
9	4	2,430				4,810					0,467	
10	4	1,290		0,935					0,607			
11	3	0,950	0,840					0,795				
12	3	1,003			0,900					0,505		
13	4	1,321			4,057					0,533		
14	3	0,911	0,892					0,725				
15		4,495		0,760					0,685			

Volume du milieu de culture	Concentrations en Formol...	
	...à 40 %	...pur
50cc	4/1.250	1 3.125
50	2.300	6.250
100	4.150	10.400
100	4.150	10.400
150	6.250	15.600
150	6.250	15.600
200	10.000	25.000
100	3.575	8.900
200	7.150	17.850
100	5.000	12.500
100	6.250	15.600
150	6.250	15.600
100	4.150	10.400
100	6.250	15.600
100	5.000	12.500

2° Si l'on compare maintenant l'action antiseptique du formol agissant à l'état dissous (première partie du tableau) et celle des mêmes doses de formol agissant à l'état de vapeurs (deuxième partie du tableau), les poids des cultures obtenues montrent que cette dernière est plus poussée.

Les numéros d'ordre vont nous permettre de faire quelques remarques ou d'expliquer les anomalies relatives à certaines de ces expériences.

(2) Les deux cultures sont nettement inférieures au témoin, mais celle qui a subi l'action des vapeurs de formol a un poids supérieur à l'autre.

La cause est probablement due au fait que le tampon récepteur de formol était placé à la partie supérieure du flacon ; nous pensons que la diffusion des vapeurs a été retardée par cette disposition.

Par la suite, et dès l'expérience suivante, le tampon de coton fut suspendu au voisinage du liquide de culture et à une distance de celui-ci ne dépassant pas un à deux centimètres.

(4) Dans cette expérience, la culture ayant subi l'action des vapeurs de formol est nettement supérieure aux autres. Mais ici la dose de formol ne fut pas mise en totalité au moment de l'ensemencement ; l'on n'en distribua que la moitié seulement (soit III gouttes de formol à 10 %), et le reste ne fut ajouté que le troisième jour ; mais à ce moment la culture avait déjà atteint un développement assez avancé.

Dans d'autres expériences, du reste (5, 6, 8 et 11), la dose de formol fut répartie en deux fois sur les tampons, la moitié le jour de l'ensemencement, l'autre moitié vingt-quatre heures après.

Or, nous avons constaté qu'à ce moment les liquides ensemencés soumis à l'action du formol ne poussaient pas encore ou ne donnaient que des traces de culture ; la nouvelle addition de formol venait renforcer l'action antiseptique de la première dose.

Dans l'expérience (13), VI gouttes de formol à 10 % ont été ajoutées dans le liquide du premier flacon ; dans le second, la même dose fut répartie moitié dans le liquide, moitié sur un tampon.

(10) Au lieu d'employer du liquide de RAULIN dilué de son volume d'eau, nous avons utilisé du liquide non dilué. Les résultats obtenus confirmant ceux des autres essais.

Dans l'ensemble, de quelque façon que l'on ait opéré, que la dose de formol ait été mise d'emblée ou qu'elle ait été distribuée en deux fois, les résultats furent les mêmes ; l'action des vapeurs de formol s'est toujours montrée sensiblement plus antiseptique que celle de la solution.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Celles-ci furent faites dans des cristallisoirs d'une contenance d'environ 200 centimètres cubes, dont les bords rodés permettaient de les fermer au moyen de plaques de verre. Pour que la fermeture soit aussi parfaite que possible, le joint était obtenu en plaçant une légère couche de vaseline sur les bords des vases.

La quantité de liquide de RAULINensemencée fut toujours de 100 centimètres cubes ; de la sorte le volume d'air le surmontant était à peu de chose près égal à celui du milieu de culture.

Les doses de formol à introduire dans l'atmosphère des vases étaient distribuées sur des tampons de coton placés directement sur la face des plaques de verre regardant le liquide ou suspendus par un fil à peu de distance de sa surface.

Nous nous sommes servi d'une solution de formol à 10 %.

Expérience 1 :

Cinq cristallisoirs reçurent chacun 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN dilué de son volume d'eau et

furentensemencés avec X gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Le premier servait de témoin.

Le deuxième et le quatrième reçurent respectivement IV et VIII gouttes de la solution de formol au dixième.

Au troisième et au cinquième, les mêmes doses furent réparties sur des tampons de coton, pour leur permettre de se diffuser dans l'air ambiant.

Après avoir été recouverts de plaques de verre, y compris le témoin, on les porta à l'étuve.

Deux jours après, le témoin montrait une belle culture, le deuxième une culture plus faible, le troisième un léger voile, les deux derniers n'avaient pas trace de culture. Le troisième jour, les deux premières cultures étaient couvertes de fructifications noires, la suivante restait blanche ; les autres ne poussaient toujours pas.

Les trois cultures furent recueillies, séchées, et donnèrent les poids suivants :

1	2	3
0 gr. 860	0 gr. 722	0 gr. 422

Le cinquième jour, les vases 4 et 5 qui avaient été laissés à l'étuve, se mirent à pousser, mais ne donnèrent que de faibles membranes à leur récolte (septième jour).

Les expériences suivantes furent conduites de la même manière, en variant simplement les doses de formol. Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau ci-contre, pour lequel nous avons adopté la même disposition que pour le précédent.

TABLEAU

Remarques. — Les expériences 3 et 5 ont été faites avec du liquide de RAULIN non dilué ; les poids de cultures obtenues sont supérieures à ceux des mêmes essais faits avec du liquide dilué, et l'action du formol s'est montrée plus nettement que dans ces derniers.

Dans les expériences 7 et 9 les doses de formol réparties sur les tampons furent distribuées en deux fois, la première addition étant faite au moment de l'ensemencement, et le reste étant ajouté vingt-quatre heures après.

Formol à 10 % (gouttes)																
N ^o	Durée	Témoins	dans le liquide							dans l'air						
			II	III	IV	V	VI	VII	X	II	III	IV	V	VI	VII	X
1	3	0gr, 860			0,732	0,933	0	0	0,093			0,422	0,870		0	0,048
2	3	4,003				0,601		[traces]	0,402				0,338		[traces]	0,423
3	3	4,562											0,780			
4	3	4,228	4,261			4,004				4,160			traces			
5	3	0,920	0,917			0,034				0,283						
6	3	2,485		4,870		0,563					4,376					
7	2	0,701		0,630			0,459				0,203		0,290	0		
8	3	0,817	0,780		0,787					0,700		0,423				
9	7	4,400	0,300		0,430					0,223		0,067				
10	7	0,307					0,080	0,070						0,103	0,182	
11	2	0,682	0,630		0,560					0,477		0,093				



En examinant l'ensemble de ces expériences, l'on constate que :

1° Les plus faibles doses de formol n'ont pas un effet antiseptique très marqué, tout au moins quant aux poids des récoltes recueillies après trois jours de végétation.

Elles ont néanmoins au début une action empêchante assez nette, puisque au bout d'un jour de croissance, alors que le témoin présentait déjà une membrane bien formée, les vases contenant ces faibles doses de formol n'offraient que de faibles cultures, notamment ceux dans lesquels les cultures étaient soumises aux vapeurs de formol.

2° L'action antiseptique se manifeste mieux à partir de V gouttes de formol (ce qui correspond à une concentration de 1 pour 11.000 en formol pur) et est très sensible pour des doses supérieures.

3° Enfin, dans la majorité des cas, l'action du formol s'est montrée plus puissante quand il agissait sous forme de vapeurs.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Comme précédemment, des cristallisoirs d'une contenance de 200 centimètres cubes recevaient 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN dilué de son volume d'eau, et étaientensemencés d'*Aspergillus*.

Le premier servait de témoin.

Le second, le troisième et le quatrième recevaient respectivement I, II et IV gouttes d'une solution de formol au dixième, que l'on distribuait sur des tampons. Le dernier recevait également IV gouttes, mais versées dans le liquide de culture.

Les vases, recouverts de plaques de verre, étaient portés à l'étuve. Au bout de trois jours, ils montraient de

belles cultures noires, qui, recueillies et séchées, donnent à l'état sec les poids suivants :

Témoin	0 gr. 955
(1)	0 gr. 957
(2)	0 gr. 888
(3)	0 gr. 672
(4)	0 gr. 885

L'action antiseptique va en croissant avec la dose de formol et est plus marquée, pour la plus forte dose, à l'état de vapeurs qu'à l'état de solution.

Nous fîmes plusieurs expériences identiques, avec les mêmes quantités de formol ; elles sont résumées dans le tableau qui figure ci-après :

Nos	DURÉE	TÉMOINS				IV
			I	II	IV	
1	3	0 gr. 955	0,957	0,888	0,672	0,885
2	3	0 gr. 819	0,852	0,779	0,685	0,717
3	2	1 gr. 308	1,047	0,896	0,295	0,870
4	2	0 gr. 617	0,606	0,472	0,275	0,433
5	3	0 gr. 750	0,720	0,718	0,355	0,413

Elles confirment les résultats du premier essai. La plus faible dose de formol se montre à peu près sans action, son effet sur les cultures étant soit légèrement excitant, soit légèrement antiseptique.

La dose supérieure a un effet plus marqué, qui s'accroît encore pour la dose suivante.

Enfin, dans tous les cas, les vapeurs de formol se sont montrées plus actives que la même dose de solution.

f) *Conclusions*

En tenant compte des résultats obtenus dans les trois séries d'expériences, nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

Dans les conditions où nous avons opéré :

1° Le formol exerce une action antiseptique très marquée sur la croissance de l'*Aspergillus niger* ;

2° Cette action antiseptique, déjà sensible pour des concentrations en formol de 1 pour 15 à 20.000, est plus manifeste pour des concentrations plus fortes et l'on peut affirmer que, lorsque la dose de formol dépasse 1 pour 5.000, l'*Aspergillus* ne pousse plus ;

3° Dans la grande majorité des cas envisagés, si l'on compare l'effet antiseptique des solutions de formol et celui des vapeurs de formol (distribuées aux mêmes doses dans le milieu de culture et dans l'air qui les entoure), ce dernier s'est montré sensiblement plus puissant.

Ceci est d'autant plus intéressant à constater que (dans le cas de flacons), les vapeurs de formol agissent dans un volume d'air infiniment plus grand que le volume de liquide qui reçoit la même dose de solution de formol.

Il est, en outre, certain que la dose de formol répartie sur les tampons n'agit pas en totalité, une certaine quantité devant se transformer sur le support en trioxy-méthylène, dont la diffusion est faible à la température de 35°.

Ceci nous montre en outre qu'il est déjà possible de modifier la croissance de l'*Aspergillus* en changeant simplement la composition de l'air dont la plante a besoin pour vivre, le milieu de culture n'étant pas modifié.

B. — *Etudes d'autres antiseptiques*

A) CHLOROFORME

Nous avons complété nos observations sur l'aldéhyde formique par l'étude de quelques antiseptiques, le chloroforme, et certaines essences. Citons d'abord les essais relatifs aux vapeurs de chloroforme.

Première expérience :

Des flacons renfermant 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN sontensemencés ; les trois premiers servent de témoins. Les suivants reçoivent respectivement :

4, 5 et 6	X gouttes de chloroforme ;
7, 8, 9	XX gouttes de chloroforme ;
10, 11, 12	XXX gouttes de chloroforme ;

Ces gouttes ne sont pas versées dans le liquide de culture, mais réparties sur des tampons de coton suspendus à l'intérieur des flacons.

Le lendemain de l'ensemencement, l'on pouvait voir des cultures dans les témoins, les trois suivants poussaient légèrement ; les six derniers n'avaient pas trace de culture.

Vingt-quatre heures après, les témoins avaient de belles cultures, les trois suivants des cultures plus faibles. Quant aux derniers, à part le huitième qui présenta quelques traces de mycélium, ils ne poussaient toujours pas.

A cette date, les premières cultures furent recueillies, séchées et pesées. Les trois derniers vases furent laissés à l'étuve ; le quatrième jour après l'ensemencement, ils se couvrirent de traces de culture qui, par la suite, se développèrent en donnant des voiles qui purent être récoltés le septième jour.

L'expérience suivante ne comporta que trois témoins et six flacons qui reçurent, par séries de trois, respectivement X et XX gouttes de chloroforme.

Ils poussèrent d'une manière tout à fait semblable à ceux de l'essai précédent, avec des retards croissant avec la dose de chloroforme ajoutée. Les cultures furent recueillies au bout de trois jours. Parmi les trois derniers vases, un seul présenta des traces de culture trop faibles pour être recueillies, les deux autres restèrent vierges.

Dans les expériences suivantes, nous n'avons changé que les doses de chloroforme en gardant la même disposition.

Leurs résultats sont rassemblés ci-après :

Nos	DURÉE	TÉMOINS	CHLOROFORME (gouttes)				
			V	X	XV	XX	XXX
1	2	0 gr. 740 0,711 0,705		0,453 0,463 0,390		» 0,177 »	0
2	3	0 gr. 735 0,686 0,675		0,473 0,532 0,400		» traces »	
3	3	0 gr. 815 0,809 0,815		0,689 0,675		» 0,933 »	
4	3	0 gr. 822 0,760 0,773	0,844 0,950 0,923	0,500 0,430 0,986		0,254	
5	5	0 gr. 870 0,930 0,920	0,878 0,815	0,695 0,810 0,774	0,765	0,728	
6	4	0 gr. 942 0,870	0,736 0,708	0,803 0,650			
7	4	0 gr. 835 0,793	0,845 0,600	0,569 0,760 0,375			

Bien que les essais aient été faits toujours dans les mêmes conditions, les résultats obtenus ont été assez irréguliers.

Il faut noter dans l'ensemble une légère diminution du poids des récoltes obtenues sous l'influence des vapeurs de chloroforme, et dans tous les cas, un retard assez considérable dans la croissance des cultures, d'autant plus grand que la dose de chloroforme essayée augmentait, retard qui tend à se combler quand on prolonge la durée des essais.

B) *Influence de quelques essences
sur la croissance de l'Aspergillus niger*

De très nombreux travaux ont été publiés sur la valeur antiseptique des huiles essentielles. La plupart des auteurs, depuis CHAMBERLAND jusqu'à ceux des dernières années, à l'aide de techniques variables, ont porté leurs recherches sur les pouvoirs infertilisant et microbicide de ces essences vis-à-vis de microorganismes déterminés, ou sur les modifications des propriétés biologiques de ceux-ci sous l'influence de ces essences.

Nous avons trouvé qu'un seul travail, dû au Docteur FORNÉ (12) et datant de la fin du siècle dernier, dans lequel l'auteur étudie l'action des essences de niaouli et cajéput sur les cultures d'*Aspergillus niger*. Ses conclusions sont :

1° Ces essences agissant dans des espaces clos et étroits, s'opposent à la culture de la bactériodie charbonneuse et de l'*Aspergillus* ;

2° Les mêmes vapeurs agissant dans des espaces clos, mais plus larges, ont empêché dans tous les cas la fructification des Mucédinées ;

3° L'action stérilisante ou empêchante des vapeurs s'exerce principalement sur le milieu de culture ;

4° La puissance stérilisante est proportionnelle au temps de contact et au degré d'imprégnation du milieu.

**

Nous avons voulu examiner ici, rapidement, l'action de quelques essences, autres que les deux précitées, sur la croissance de l'*Aspergillus niger*. Notre choix s'est arrêté sur quatre d'entre elles, prises parmi les plus antiseptiques (du moins quant à leur action microbicide) ; ce sont les essences de cannelle, girofle, thym et amandes amères.

La technique utilisée fut la même que dans toutes les expériences précédentes. Des flacons ou cristallisoirs con-

tenant du liquide de Raulin (100 centimètres cubes) étaientensemencés d'*Aspergillus*, et soumis aux vapeurs des diverses essences, distribuées sur des tampons de coton fixés ou suspendus au voisinage de la surface du milieu de culture. Les récipients étaient fermés, puis portés à l'étuve à 35°.

Nous avons réuni les résultats des diverses expériences dans les tableaux qui suivent, chacun ayant trait à l'une d'entre elles.

Essence de Cannelle de Ceylan

Nos	Durée	Témoins	Nombre de gouttes				
			I	II	V	X	XX
1	3	0 gr. 615 1,094		0,910	1,338	1,106	0,824
2	3	1,410		1,400 1,735	0,985 1,200		
3	2	1,818	0,710	0,750	0,685	0	0
4	2	2,517 2,245		0,912 1,650	0	0	
5	3	2,541 2,504		2,296 2,404	0,620 2,563		
6	3	2,145	1,948		0,500		
7		2		2,225 2,064	2,195	2,277	
8	2	1,761 2,268		1,606	0,932		
9	2	2,220 2,353		2,001 1,972	1,768 1,810	1,545 1,532	
10	2	2,475 2,647		1,530 5,495	0,904 2,188	0	
11		1,270 1,343		1,425 1,285	1,700 1,006	1,375	
12	3	2,600 2,615		1,480 2,410	1,220 2,250		

Essence de Girofle

N ^{os}	Durée	Témoins	Nombre de gouttes				
			II	V	X	XX	L
1	6	1 gr. 965 1,480	0,732 0,843	0,783 0,341	0,765 0,115	0,350	
2	5	1,730 2,650	1,100 0,760	2,002 1,957	0,580 0,750		0,655
3	3	2,495 2,568	2,505 2,600	1,740 2,390	0,210 0,335		traces
4	3	1,140 0,668	2,510 2,180	1,347 2,217	1,118 0,880		traces
5	2	1,915 1,837	1,445 1,393	0,933 1,070	0,683 0,930		
6	3	2,073 1,925	1,816 1,758	1,834 1,511	1,418 1,106		
7	2	1,993 1,767	1,900 1,167	0,780 0,195	traces »		
8	3	2,215 2,250	2,243 2,140	1,400 2,211	0,350 1,955		
9	3	1,016 1,913	0,936 0,706	2,393 0,584	0,777 0,910		
10	3	2,575 2,262	2,115 2,524	1,438 2,098	0,495 0,793		
11	2	1,480 1,875	0,777 1,331	0,642 »	0,516 0,915		
12	3	1,954 1,944	1,698 1,715	0,711 0,683			
Moyennes :		1,916	1,620	1,348	0,825	»	»

Essence d'amandes amères

Durée	Témoins	I	II	V	X	XX
3	0,935 0,933		0,475 0,400	0	0	0
3	2,350 2,423		Traces	0	0	
3	4,934	4,345	0,340	0		
4	4,096 4,545	0,652 0,450	Traces			
2	4,606 4,728	0,230	0			
2	4,707 4,962	0,400	0			

Essence de thym

Durée	Témoins	I	II	V	X	XX
4	1,121 0,862		0,867	0	0	0
4	2,344 2,220		2,084	0	0	
4	4,990		0	0	0	
4	4,056 4,545	0,487 0,200	0			
2	4,606 4,728	4,402	0,960			
2	4,707 4,962	4,100 4,700	0,670			

Avec les essences de cannelle et de girofle, les résultats obtenus furent très irréguliers.

D'une manière générale, les cultures soumises aux vapeurs de ces essences poussèrent plus difficilement que les témoins et formèrent difficilement leurs fructifications.

Comme le montrent les essais faits avec l'essence de cannelle, le retard des cultures peut atteindre deux jours, même avec des doses relativement faibles d'essence.

Si l'on fait la moyenne des poids des cultures de toutes les expériences pour chaque dose de chacune de ces deux essences, l'on voit cette moyenne diminuer au fur et à mesure que la quantité d'essence augmente. Mais il faut atteindre de fortes doses (L gouttes d'essence) pour avoir une sensible diminution de cultures.

Les essences de cannelle et de girofle n'ont donc qu'une faible influence sur la croissance de l'*Aspergillus*.

Il n'en est pas de même pour les essences de thym et d'amandes amères.

Les expériences, en nombre volontairement limité, nous montrent qu'il suffit de très faibles quantités de chacune d'entre elles pour empêcher totalement la culture de l'*Aspergillus niger*.

C. — APPLICATIONS

A). *Essais de conservation d'un bouillon par les vapeurs de formol*

Etant donnés des résultats obtenus, montrant l'action énergique d'un antiseptique gazeux, le formol, nous avons cherché à appliquer les propriétés antiseptiques des vapeurs de formol à la conservation de substances susceptibles de s'altérer sous les influences microbiennes.

Nous nous sommes adressés en premier lieu au bouillon de viande ; nous avons étudié, par diverses expériences, s'il était possible d'empêcher le développement des germes dans ce milieu, préalablement ensemencé, au moyen des vapeurs de formol, et de déterminer les doses antiseptiques.

Rappelons pour mémoire qu'il ne faut pas confondre doses *antiseptiques ou infertilisantes* (13), doses qui empêchent un milieu de culture de pousser, quand on l'ensemence avec un germe déterminé — doses microbicides, doses qui tuent les germes non sporulés en évolution au bout d'un laps de temps déterminé (dans le premier cas on empêche leur développement, dans le deuxième, on l'arrête) — et doses germicides, doses qui tuent les germes sporulés.

Nous nous sommes servis pour ces essais de ballons jaugés d'un litre, à col long et étroit que l'on emplissait à moitié ou jusqu'au trait de jauge du milieu de culture, et que l'on ensemençait de *Pseudomonas prodigiosa*.

Expérience 1 :

Quatre ballons stériles renfermant chacun un litre de bouillon de viande dilué (1 volume de bouillon pour 9 volumes d'eau distillée stérile), sont ensemencés avec II gouttes d'une émulsion aqueuse de *Pseudomonas prodigiosa*.

Le premier sert de témoin.

Le deuxième reçoit II gouttes de formol du commerce (à 40 %). Au troisième et au quatrième, l'on

ajoute respectivement II et V gouttes de formol, que l'on répartit sur des tampons de coton suspendus par un fil à distance d'environ un centimètre de la surface du bouillon.

L'on abandonne les ballons à la température du laboratoire (20°). Les concentrations en formol, tous calculs faits, sont de 1/15.000 en formol commercial ou 1/37.500 en formol pur pour les ballons 2 et 3 ; 1/6.000 en formol commercial ou 1/15.000 en formol pur pour les ballons 4.

Le lendemain de l'ensemencement, le témoin est nettement trouble, le ballon 2 est limpide, 3 est légèrement trouble, 4 est limpide.

Deux jours après, le témoin cultive abondamment, 2 reste limpide, 3 est nettement trouble, et 4 commence à cultiver. Trois jours après, les trois flacons sont tous troubles.

Expérience 2 :

Elle est identique à la précédente, les doses de formol sont les mêmes.

Deux jours après l'ensemencement, le témoin est très trouble, 2 est limpide, 3 et 4 sont légèrement troubles.

Le jour suivant, tous trois sont troubles.

Expérience 3 :

Les ballons stériles renferment seulement 500 centimètres cubes de bouillon dilué, que l'on ensemence avec une goutte de l'émulsion de *Prodigiosus*.

Le premier sert de témoin. Le deuxième reçoit II gouttes de formol au dixième. Les ballons 3 et 4 sont munis de tampons de coton suspendus au voisinage de la surface du bouillon, et sur lesquels on répartit respectivement II et V gouttes de formol au dixième.

Les concentrations en formol pur sont de :

1/50.000 dans les ballons 2 et 3 ;

1/20.000 dans le ballon 4.

Deux jours après l'ensemencement, le témoin, 2 et 3 sont troubles, 4 est limpide.

Expérience 4 :

Même disposition. Le quatrième jour, tous sont troubles ; 1 sert de témoin. L'on ajoute II gouttes de formol dans le bouillon du ballon 2. L'on répartit II et V gouttes de formol sur les tampons des ballons 3 et 4.

Les concentrations sont de :

1/18.750 dans les ballons 2 et 3 ;

1/7.500 dans le ballon 4.

Le lendemain de l'ensemencement, le témoin est trouble, 2 et 4 sont limpides, 3 est légèrement trouble. Deux jours après, 3 est franchement trouble, 2 et 4 restent clairs.

Expériences 5 et 6 :

Même disposition.

L'on ajoute III gouttes de formol dans le bouillon du ballon 2. L'on en verse III et VI gouttes sur les tampons des ballons 3 et 4.

Les concentrations respectives sont de :

1/12.500 et 1/6.250.

Deux jours après, le témoin seul est trouble, les autres sont limpides. Les résultats restent inchangés au bout de quatre, six et huit jours.

A ce moment, l'on prélève au moyen de pipettes stériles, dans chacun des ballons, V gouttes que l'on sème dans des tubes de bouillon de viande stérile. Ces tubes portés à l'étuve ne poussèrent pas. C'est donc que la stérilisation des bouillons par le formol était complète.

*
**

Pour les interpréter plus facilement, nous avons rassemblé ci-dessous les résultats de ces expériences dans un tableau, où nous avons indiqué au-dessous des diverses

concentrations en formol les changements survenus dans les ballons. Nous indiquons par une croix les troubles apparus, et par un 0 les ballons qui restent limpides.

DURÉE	1	1	1	1	1	1	1	1
	50.000	37.500	20.000	18.750	15.000	12.500	7.500	6.250
1	+	+	0	+	0	0	0	0
2	+	+	0	+	0	0	0	0
3	+	+	+	+	+	0	0	0
4	+	+	+	+	+	0	0	0
6	+	+	+	+	+	0	0	0
8	+	+	+	+	+	0	0	0

Séparons les résultats obtenus pour la solution et les vapeurs de formol.

1° Solution de formol :

Les faibles concentrations n'empêchent pas le développement du *Prodigiousus* dans le bouillon (1/50.000) ou ne font que le retarder (1/37.500). Le retard est déjà plus sensible et atteint trois jours pour la concentration de 1/18.750.

A partir de 1/12.500, la solution de formol empêche le développement pendant huit jours au moins.

2° Vapeurs de formol :

Les concentrations les plus faibles n'arrivent pas à empêcher le départ des cultures ; tout au plus marquent-elles une gêne dans ce développement, gêne décelée par un trouble moins accentué que celui des témoins.

Avec une concentration des vapeurs de 1/20.000, nous avons réussi à retarder de deux jours le développement des germes.

Mais pour des doses plus fortes, les résultats obtenus furent les mêmes qu'avec la solution de formol, et une

concentration de 1/12.500 suffit largement à assurer la stérilisation complète du bouillon.

Il est donc possible d'empêcher le développement des germes dans un bouillon, en le soumettant simplement au contact d'un air renfermant des doses relativement faibles de vapeurs de formol.

B) *Essais de conservation du lait par
les vapeurs de formol*

Nous savons que des doses, même faibles, de solution de formol suffisent à assurer la conservation du lait, en empêchant la fermentation lactique.

Nous avons cherché à obtenir cette conservation à l'aide, non pas de solution, mais de vapeurs de formol et à déterminer l'ordre de grandeur des doses nécessaires pour obtenir ce résultat.

Toutes nos expériences furent faites à la température du laboratoire (environ 20°), des essais préalables nous ayant montré qu'à l'étuve vers 35°, l'acidification du lait se fait beaucoup trop rapidement, en des temps généralement inférieurs à douze heures ; il n'est donc guère facile de suivre la marche de la fermentation en un temps aussi court. En la laissant, au contraire, s'effectuer à une température voisine de 20°, le laitensemencé de ferment lactique ne se coagule qu'entre vingt-quatre et quarante-huit heures, et par des dosages espacés, l'on peut suivre le progrès de l'acidification.

Nous avons opéré sur du lait écrémé par centrifugation dans une écrémeuse, puis dilué de son volume d'eau distillée. Le lait écrémé et dilué était réparti dans des ballons à fond plat de 125 et 250 par quantités de 100 ou 200 centimètres cubes. L'on stérilisait le tout à l'autoclave à 110°.

Pour faire les expériences, l'on ensemençait chaque ballon avec un nombre de gouttes déterminé (X par exemple) d'une émulsion aqueuse de bacilles lactiques, et on les abandonnait à la fermentation à 20°.

Chaque expérience comportait un témoin et des ballons qui recevaient des doses variables de formol.

Expérience 1 :

Des ballons contenant 100 centimètres cubes de lait écrémé, non dilué, et stérile, sontensemencés de ferment lactique, et fermés au moyen de bouchons de liège.

Le premier sert de témoin.

Au deuxième l'on ajoute 1 goutte de formol du commerce, que l'on répartit dans le lait par agitation.

Les bouchons des deux derniers ballons supportent des tampons de coton, suspendus par un fil au voisinage de la surface du lait, et sur lesquels on répartit respectivement I et II gouttes de formol.

On abandonne les ballons à la température de laboratoire. L'on mesure l'acidité initiale sur 10 centimètres cubes de lait par la soude N/10 en présence de phénol-phtaléine ; il en faut 1 cc. 9 pour obtenir le virage au rose.

Nous avons titré jour par jour cette acidité dans les différents ballons ; nous en exprimons les résultats en centimètres cubes de soude N/10 nécessaires pour la saturation de 10 centimètres cubes de lait.

ACIDITÉS	TÉMOIN 1	2	3	4
INITIALE	1,9	1,9	1,9	1,9
1 jour	7,5 ↓	»	»	»
2 —	9,5	»	»	»
4 —	»	»	»	»
6 —		2	2	2
7 —		2,3	2,2	2,3
9 —		2,5		2,4
11 —		2,5	2,3	2,5

Le témoin était coagulé vingt-quatre heures après l'ensemencement (flèche ↓) ; les autres gardèrent l'acidité initiale pendant six jours, et le onzième jour elle n'avait guère augmenté.

Les concentrations en formol, tous calculs faits, sont de :

1/7.500 en formol pur pour 2 et 3 ;

1/3.750 en formol pur pour 4.

Nous voyons que la plus faible de ces deux concentrations suffit à assurer la conservation du lait pendant onze jours au moins.

Expérience 2 :

Dans cette expérience et les suivantes, nous avons employé du lait dilué de son volume d'eau distillée.

Le premier ballon sert de témoin.

Aux ballons 2 et 3 l'on ajoute respectivement V et X gouttes d'une solution de formol au dixième.

Dans les ballons 3 et 5, les mêmes doses sont réparties sur des tampons surmontant le lait.

Les concentrations en formol pur sont de :

1/11.000 pour les ballons 2 et 4 ;

1/5.500 pour les ballons 3 et 5.

Voici, rassemblés comme précédemment, les chiffres donnant la quantité de soude N/10 nécessaire à la saturation de l'acidité. (Prise d'essai de 20 centimètres cubes, correspondant à 10 centimètres cubes de lait).

ACIDITÉS	TÉMOIN 1	2	3	4	5
INITIALE	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
2 JOURS	11,5 ↓	2,15	2,15	2,35	2,3
3 —		2,25	2,2	2,6	2,5
4 —		2,3	2,3	2,85	
5 —			2,3	2,9	2,5
7 —		2,5	2,3	3	2,5
9 —		12,2 ↓	3	12 ↓	10,5 ↓

Nous voyons que pour ces concentrations, le lait se maintient jusqu'au huitième jour avec une acidité faible, mais la fermentation lactique n'est que retardée et le neuvième jour, la coagulation du lait est complète dans trois cas sur quatre.

Expérience 3 :

Identique à la précédente, mais les doses de formol diffèrent. Le ballon 1 sert de témoin. Les ballons 2 et 4 reçoivent respectivement II et V gouttes de formol au

dixième ; dans les ballons 3 et 5, les mêmes doses sont réparties sur des tampons.

Les concentrations en formol sont de :

1/27.500 pour les ballons 2 et 4 ;

1/11.000 pour les ballons 3 et 5.

ACIDITÉ INITIALE	TÉMOIN 1	2	3	4	5
	2	2	2	2	2
1 jour	3	2,2	2,1	2,2	2,1
2 —	11,8 ↓	3,6	2,3	4,8	2,7
4 —		12,2 ↓	5,5	12	12,5 ↓
5 —			10 ↓		

Ces concentrations retardent l'acidification du lait pendant deux à trois jours et la précipitation a lieu le quatrième jour pour la plus forte, le quatrième et le cinquième pour la plus faible.

Expérience 4 :

Ici les quantités de lait diluéensemencées sont de 200 centimètres cubes, contenues dans des ballons de 250 centimètres cubes.

Un sert de témoin. Les ballons 2, 3 et 4 reçoivent respectivement V et X gouttes de formol au dixième et II gouttes de formol commercial. Les mêmes doses sont réparties sur les tampons respectifs des ballons 5, 6 et 7.

Les concentrations en formol pur sont de :

1/22.000 pour les ballons 2 et 5 ;

1/11.000 pour les ballons 3 et 6 ;

1/7.500 pour les ballons 4 et 7.

ACIDITÉ INITIALE	TÉMOIN 1	2	3	4	5	6	7
	2	2	2	2	2	2	2
1 jour	6,6	2,2	2	2	2,5	2	2,1
2 —		2,1	2,2	2,4	4,7	3,4	2,3
3 —		4,8	2,3	2,3	5,5	5,3	2,3
4 —		10,5 ↓	6	3,3	10,5 ↓	5,8	2,5

Résumons les résultats des expériences que nous venons d'exposer :

1° Pour les très faibles concentrations en formol ($1/27.500$ et $1/22.000$), l'on n'obtient qu'un retard de la fermentation, retard néanmoins sensible puisqu'il atteint trois jours.

Avec des concentrations plus fortes ($1/11.000$) nous avons conservé le lait pendant des temps variant de quatre à sept jours et la coagulation complète n'avait lieu que les cinquième et neuvième jours.

Enfin, pour les plus fortes concentrations ($1/7.500$ et au-dessus), le lait se conserve pendant plus de douze jours et son acidité a augmenté à peine au bout de ce laps de temps.

2° Si nous comparons les effets de la solution de formol et ceux de ses vapeurs, l'on constate que, pour les mêmes doses, les acidités croissent parallèlement, parfois un peu plus vite dans le cas des vapeurs.

Il n'est pas moins intéressant de voir que nous avons pu empêcher la fermentation du lait en le soumettant simplement à des doses relativement faibles de vapeurs de formol.

D. — *Essais de pénétration des vapeurs de formol*

Nous connaissons le pouvoir antiseptique des vapeurs de formol et nous avons prouvé expérimentalement que de faibles doses répandues dans l'air suffisent à empêcher le développement des bactéries dans le bouillon et à assurer la conservation du lait.

Les vapeurs de formol, au lieu d'agir brutalement, ont une action lente et continue qui permet d'assurer la stérilisation complète des milieux de culture divers soumis à leur action.

Nous avons voulu nous rendre compte du pouvoir pénétrant de ces vapeurs en fixant d'une manière visible les progrès de leur pénétration au sein des milieux que l'on cherchait à stériliser.

Pour cela, nous nous sommes adressés à une réaction colorée due à M. TRILLAT, basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses de fuchsine acide de se colorer en bleu violet sous l'influence du formol : si, dans un tube à essai contenant une dizaine de centimètres cubes d'eau colorée en rouge par quelques gouttes (V suffisent) d'une solution aqueuse à 1 % de fuchsine acide, l'on ajoute une ou plusieurs gouttes de formol, la coloration change peu à peu à froid pour prendre assez rapidement une teinte bleu violacé.

Si, au lieu d'ajouter le formol à la solution de fuchsine, on le distribue sur un tampon de coton suspendu dans le haut du tube au-dessus du liquide, le tube étant fermé par un bouchon, la solution change de teinte identiquement.

Mais en opérant ainsi, les particules liquides étant sans cesse en mouvement, le liquide se colore uniformément du haut en bas du tube, sans que l'on puisse délimiter le champ d'action des vapeurs de formol. Nous avons alors cherché à opérer sur des milieux solides.

Pour cela il suffit d'ajouter à la solution de fuchsine de la gélatine dans la proportion de 5 %, à chaud, et de distribuer ce milieu dans des tubes à essai jusqu'à une distance d'environ trois centimètres des bords.

La solidification se fait par refroidissement.

Nous avons fait l'expérience suivante, qui, répétée à plusieurs reprises, donna toujours les mêmes résultats :

Des tubes à essai remplis du milieu solide sont fermés au moyen de bouchons de liège auxquels on suspend des tampons de coton destinés à recevoir du formol.

Le premier sert de témoin.

Les suivants, numérotés de 1 à 5, reçoivent respectivement les doses suivantes : II et V gouttes de formol commercial. Puis ils sont bouchés et abandonnés à la température du laboratoire.

Dans ces conditions, les vapeurs de formol se diffusent lentement à travers la masse solide et l'on peut suivre leur diffusion par le changement de coloration. Nous avons noté jour par jour les progrès de la pénétration en fixant approximativement les limites des zones colorées et en les mesurant.

DATES	TUBE 1	2	3	4	5
1 jour	15 mm.	18	25	25	25
2 —	25 —	28	40	40	40
3 —	35 —	40	50	50	50
5 —	↓	↓	60	65	65
8 —			↓	70	80
12 —				↓	↓

Il est visible que, même pour de faibles doses de formol, les vapeurs ont un pouvoir pénétrant assez prononcé ; les derniers jours, bien que les progrès se soient accentués, il fut difficile de les noter exactement, car les colorations se fondaient graduellement.

Néanmoins, il nous fut assez facile de fixer les limites de la pénétration en nous servant de la propriété que possède la gélatine ayant fixé le formol de ne plus se dissoudre dans l'eau et de fondre à une température plus élevée.

Le douzième jour, nous avons donc porté les tubes au bain-marie, la partie inférieure non colorée se liqué-

fait et la fusion s'arrêtait d'une façon très nette à la limite inférieure de pénétration du formol. Nous avons pu mesurer à un millimètre près les hauteurs des portions qui résistaient à la fusion ; les voici :

Tube N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
1 cm.	3 cm.	4 cm.	5 cm. 5	7 cm.

Nous constatons que la pénétration, rapide au début, se ralentit par la suite ; l'on pourrait, du reste, tracer une courbe en prenant pour abscisses les doses de formol et pour ordonnées les hauteurs du milieu solide insolubilisé par le formol ; cette courbe serait une branche de parabole.

Nous avons répété ces essais en remplissant à moitié des ballons à fond plat de 125 centimètres cubes avec le milieu gélatiné coloré par la fuchsine et en suspendant aux bouchons des tampons destinés à recevoir le formol.

Les phénomènes observés furent les mêmes, la coloration violette se propage en même temps que la gélatine s'insolubilise. En portant au bout de quelques jours ces ballons au bain-marie, la partie insolubilisée et colorée a sensiblement la forme d'une calotte sphérique dont le centre serait le tampon de formol.

Dans un cas, nous avons mis V gouttes de formol et arrêté l'expérience le septième jour. Sur 85 grammes de milieu solide, 40 grammes furent insolubilisés, soit 47 % de la masse soumise aux vapeurs de formol.

Conclusions : Ces expériences nous montrent que les vapeurs de formol ont un grand pouvoir de pénétration dans les milieux solides soumis à leur action.

Il est donc plausible de concevoir que dans un milieu liquide, dont les particules sont en perpétuel mouvement, ces vapeurs se propagent avec une vitesse infiniment plus grande et pénètrent plus profondément.

Les bactéries qu'ils renferment sont donc soumises à un brassage continu au sein de la masse liquide, en même temps qu'elles subissent les effets de quantités de formol sans cesse renouvelées. Les cultures sont ainsi lentement et sûrement stérilisées.

DEUXIEME PARTIE

INTRODUCTION

Après avoir étudié l'action antiseptique du formol sur la croissance de l'*Aspergillus niger*, il nous parut intéressant de rechercher quelle influence auraient sur le développement de la Mucédinée l'ammoniaque et d'autres corps azotés plus ou moins volatils.

L'ammoniaque, base forte, exerce en général une action nocive et toxique sur les tissus vivants. Mais, d'autre part, ceux-ci ont besoin, pour vivre, d'azote ou de combinaisons azotées plus assimilables.

Dans le cas particulier qui nous intéresse, la présence de sels ammoniacaux est indispensable au développement normal de l'*Aspergillus*.

Les essais de RAULIN lui montrèrent que le rapport des récoltes avec et sans nitrate d'ammoniaque varie de 24:1 à 153:1 ; que le nitrate d'ammoniaque peut être remplacé par le nitrate de potasse ou le tartrate d'ammoniaque (celui-ci est aussi actif sur la végétation que le nitrate).

Ses conclusions sont les suivantes : « En résumé, dit-il, l'acide nitrique et l'ammoniaque, à l'état de sels, produisent sur la végétation des effets analogues ; d'où il résulte que c'est à l'azote que ces deux composés si différents doivent leur efficacité. »

C'est en se basant sur ces conclusions qu'il détermina les quantités des trois sels ammoniacaux qui entrent dans la composition de son milieu artificiel, à savoir le sulfate, le phosphate et le nitrate d'ammonium, ce dernier étant de beaucoup le plus important de tous.

La nutrition azotée des Cryptogames fit l'objet d'un travail relativement récent de M. le Professeur agrégé D. BACH (14), qui s'adressa à l'*Aspergillus repens* de Bary, et étudia l'influence de la réaction du milieu.

Après avoir analysé les travaux antérieurs, il montra que les conidies de l'*Aspergillus repens* ne germent qu'entre les limites $2,6 < \text{Ph} < 8,4$.

Comme aliment azoté, il prit des citrates, des sels ammoniacaux d'acides minéraux et organiques, des aminoacides, des amides, de la peptone à une concentration telle que le milieu soit toujours N/10 en azote.

Il conclut que toutes les formes de l'azote, les aminoacides compris, sont d'abord transformées en ammoniacque et celle-ci, copulée aux résidus carbonés, issus principalement de la rupture de la molécule sucrée, conduit aux protides par l'intermédiaire probable, mais non constamment obligatoire, des acides aminés.

Le rôle prééminent de l'ammoniacque doit se traduire par divers phénomènes :

Supériorité des récoltes obtenues sur les sels ammoniacaux ;

Consommation par préférence de l'azote ammoniacal dans un mélange de plusieurs formes ;

Transformation préalable de toutes les autres combinaisons azotées en ammoniacque.

Nous avons donné au début de ces pages la formule du milieu de RAULIN et les proportions des différents sels qui le composent ; il est donc inutile de les rappeler ici.

Etant établi qu'un tel milieu renferme les quantités de sels ammoniacaux nécessaires et suffisantes au bon développement du végétal, nous avons voulu nous rendre compte de l'effet qu'exercerait sur sa croissance l'ammoniacque (solution aqueuse du commerce ou vapeurs alcalines que dégage cette dernière).

Ensuite nous avons étudié l'action d'un de ses sels, l'acétate d'ammoniacque, de quelques amines grasses ou aromatiques.

Enfin nous avons exposé les cultures à des atmosphères chargées de vapeurs nitreuses et nous citerons les résultats obtenus en soumettant les cultures aux émanations putrides dégagées par les cultures d'une des bactéries de la décomposition organique, le *Pseudomonas prodigiosa*.

A. — Essais sur l'ammoniaque

Les expériences qui suivent ont été conduites de la même manière que celles qui ont été faites avec le formol. Les vases clos utilisés furent, soit des flacons d'une capacité d'un litre, fermés au moyen de bouchons de liège, soit des cristallisoirs couverts par des plaques de verre.

1° Série d'expériences :

Des cristallisoirs renfermant 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN dilué de son volume d'eau, sont ensemencés avec X gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Le premier sert de témoin.

Le second et le quatrième reçoivent respectivement II et V gouttes de la solution ammoniacale du commerce. Dans le troisième et le cinquième, les mêmes doses sont distribuées sur des tampons de coton suspendus au-dessus de la surface du liquide.

Les vases recouverts de plaques de verre sont alors placés à l'étuve.

Vingt-quatre heures après, les cinq cultures se développaient normalement. Elles furent recueillies au bout de deux jours, mises à sécher et donnèrent les poids suivants à l'état sec :

1	2	3	4	5
0 gr. 388	0,668	0,692	0,550	0,665

Il est facile de calculer les concentrations en ammoniaque. Le compte-gouttes utilisé donnait XXIII gouttes au centimètre cube, et la solution d'ammoniaque du commerce renferme 20 % de gaz ammoniac.

Concentrations des vases 2 et 4 :

$$\frac{2}{23} \times \frac{1}{100} \times \frac{20}{100} = \frac{1}{6.750}$$

des vases 3 et 5 :

$$\frac{5}{23} \times \frac{1}{100} \times \frac{20}{100} = \frac{1}{2.300}$$

Les expériences suivantes ne diffèrent de la précédente que par les doses d'ammoniaque ajoutées dans le milieu de culture ou dans l'air ambiant. Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau qui suit, dans lequel

N ^{os}	Durée	Témoins	dans le liquide					Ammoniaque (gouttes)					dans l'air ambiant				
			I	II	III	IV	V	X	I	II	III	IV	V	X			
1	2	0,388		0,668			0,350			0,692			0,665				
2	3	0,865	0,920	0,994				0,940	0,951								
3	3	0,863			0,970					0,930				0			
4	4	0,978	0,942	1,007				0,988	0,973					0			
5	3	0,763			0,796		0,267			0,573	0,800		0,305				
6	2	0,475		0,615		0,640						0,591					
7	3	0,862		0,940			0,932			0,920		0,	0,939				
Concentrations :			1/1150	1/5750	1/3830	1/2875	1/2300	1/1950									

la même disposition a été observée que pour le formol.

Les concentrations en ammoniacque des liquides de culture sont indiquées dans le bas du tableau.

2° Dans la deuxième série d'expériences, les vases utilisés étaient des flacons identiques à ceux que nous avons employés pour les expériences relatives au formol. Ces flacons recevaient 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN et étaient ensemencés par XX gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Expérience 1 :

Le premier flacon sert de témoin.

Le second et le quatrième sont additionnés respectivement de I et II gouttes d'ammoniacque du commerce.

Les mêmes doses sont distribuées au troisième et au cinquième, mais réparties sur des tampons de coton suspendus au moyen d'un fil à l'intérieur des flacons à un ou deux centimètres au-dessus de la surface du liquide.

Les vases portés à l'étuve donnèrent de belles cultures qui furent recueillies au bout de deux jours et séchées. Voici leurs poids à l'état sec :

1	2	3	4	5
0 gr. 715	0.806	0.791	0.804	0.805

Les expériences suivantes ne diffèrent de celle-ci que par leur durée ou les doses d'ammoniacque ajoutées.

Elles sont rassemblées ci-après (tableau). Les concentrations sont indiquées.

N ^{os}	Durée	Témoins	dans le liquide						Ammoniaque (gouttes)					V	Moy.
			I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV			
1	2	0gr,715	0,806	0,804					0,794	0,803					0
2	3	1,008				0,875		0	1,400	0,993		0,937			0
3	3	0,820	1,143	1,225											
4	3	0,884				1,085		0	0,989	1,058		0,926			0
5	4	0,590	1,053	1,070											
6	4	0,490				0,780		0	0,760	0,800		1,006			0
7	2	0,758	0,860	0,821										0	
8	2	0,673			0,780		0				0,855				
9	3	0,643	0,870	1,085	0,906	0,774			0,844	1,045	0,895	0,907			
10	5	1,130	1,215	1,271	1,160	1,013			0,930	1,265	1,146	1,120			
Concentrations:			1/11500	1/5750	1/3830	1/2875	1/2300	1/1915							

Quelles conclusions peut-on tirer de la lecture de ces tableaux ? On peut déduire des résultats des expériences précédentes que, dans les conditions où nous avons opéré : .

1° Tout d'abord les faibles concentrations en ammoniacque (de 1 pour 11.000 à 1 pour 3.000) ont un effet excitant sur la croissance de l'*Aspergillus* et permettent d'obtenir des cultures de poids supérieur à ceux des témoins ;

2° Les concentrations plus fortes (au-dessus de 1 pour 3.000) montrent un ralentissement marqué de la végétation, et l'on peut affirmer que, lorsque la teneur en ammoniacque dépasse 1 pour 2.000, l'*Aspergillus* ne pousse plus ;

3° La dose d'ammoniacque qui, d'après les essais précédents, semble la plus favorable à la croissance et a permis d'obtenir les plus belles récoltes, est celle qui correspond à la concentration de 1 pour 5.750 ;

4° Enfin, si nous comparons les effets de l'ammoniacque ajoutée directement au liquide de culture et ceux des mêmes doses agissant à l'état de vapeurs, ils semblent sensiblement identiques.

Les poids de culture les plus forts ont été aussi obtenus par l'addition dans l'atmosphère des récipients de II gouttes d'ammoniacque, correspondant à la concentration de 1 pour 5.750 et les doses antiseptiques se sont montrées comparables.

3° Nous venons de voir que l'ammoniacque (agissant à l'état dissous ou sous forme de vapeurs) exerce une action non négligeable sur la croissance de l'*Aspergillus* et nous savons, d'autre part, que dans un milieu artificiel privé totalement de sels ammoniacaux, l'on n'obtient que de très faibles récoltes, dont les poids peuvent ne pas dépasser 1/150 du poids des récoltes obtenues sur un milieu complet renfermant ces sels en proportions convenables.

Ceci nous suggéra l'idée de préparer un milieu de culture sans sels ammoniacaux, de l'ensemencer d'*Aspergillus*, et de chercher quelle serait l'influence exercée sur la croissance par des quantités croissantes d'ammoniaque.

Nous avons donc préparé le milieu suivant, ne différant du liquide de RAULIN que par l'absence de sels ammoniacaux (nous le désignerons sous le nom de milieu modifié) :

Sucre candi	70 grammes
Eau distillée	1,500 —
Acide tartrique	4 —
Carbonate de potasse	0,60 —
Carbonate de magnésie	0,40 —
Sulfate de zinc	0,07 —
Sulfate ferreux	0,07 —
Silicate de potasse	0,07 —

Puis nous fîmes quelques essais dans lesquels la proportion de sels ammoniacaux du liquide de culture était diminuée progressivement, de manière à suivre la décroissance des poids de récoltes obtenues.

Pour cela, la quantité de liquideensemencé restant toujours la même (100 centimètres cubes), des volumes décroissants de liquide de RAULIN étaient complétés de volumes croissants de liquide modifié. Ainsi, les autres éléments du milieu ne changeant pas, seule la proportion de sels ammoniacaux allait en diminuant d'un vase à l'autre.

Essai n° 1 :

Des flacons reçurent :

Le premier : 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN ;

Le second : 80 centimètres cubes de liquide de RAULIN plus 20 centimètres cubes de liquide modifié ;

Le troisième : 60 centimètres cubes de liquide de RAULIN plus 40 centimètres cubes de liquide modifié ;

Le quatrième : 40 centimètres cubes de liquide de RAULIN plus 60 centimètres cubes de liquide modifié ;

Le cinquième : 20 centimètres cubes de liquide de RAULIN plus 80 centimètres cubes de liquide modifié.

Après ensemencement avec XX gouttes d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*, ils furent portés à l'étuve. les cultures recueillies le quatrième jour, montrèrent des poids décroissants du premier au dernier.

Un autre essai identique donna des résultats semblables.

Essai n° 3 :

Cet essai fut fait dans des cristallisoirs non couverts (car seule la composition du milieu intervient ici).

Le premier recevait 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN ; les suivants des volumes de ce dernier décroissant jusqu'à 10 centimètres cubes et des volumes complémentaires de liquide modifié.

Ils donnèrent, comme précédemment, des poids de récolte allant en diminuant.

Dans deux autres essais, la proportion de sels ammoniacaux fut encore diminuée. Les récoltes baissèrent jusqu'à atteindre des poids inférieurs à 100 milligrammes.

Ces quelques essais sont réunis ci-contre ; leur nombre a été volontairement limité, car ils ne servent qu'à marquer la transition entre des cultures normales et celles qui, privées de sels ammoniacaux, n'ont donné que des voiles pesant quelques centigrammes.

Il est facile de se rendre compte de la diminution des poids de récoltes avec l'affaiblissement de la teneur du milieu de culture en sels ammoniacaux ; les concentrations baissant de 2,23 0/00 (liquide de RAULIN normal) à 0,016 0/00 dans le dernier cas, la moyenne des cultures varie de 1 gr. 300 à 0 gr. 064 (soit vingt fois plus faible).

Il ne faudra donc pas s'étonner des faibles poids obtenus pour les témoins, dans les expériences qui vont suivre.

Composition du milieu de culture en sels ammoniacaux											
N ^{os}	Eutée	100cc. liq R									
		80 liq R	60 liq R	40 liq R	20 liq R	10 liq R	5 liq R	2 liq R	1 liq R	0,5 liq R	
Concentrations %/on :		2,59	1,94	1,29	0,65	0,32	0,16	0,064	0,032	0,016	
1	4	4gr.466	1,188	1,453	0,860						
2	2	0,959	0,778	0,693	0,536						
3	2	4,470	1,188	0,988	0,633	0,375					
4	2				0,538	0,350	0,271	0,111	0,085	0,049	
5	2				0,550	0,380	0,258	0,144	0,110	0,079	
Moyennes		4,300	1,051	0,944	0,623	0,368	0,265	0,188	0,098	0,064	

Expérience :

Trois flacons reçoivent 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN, tous les autres la même quantité de liquide modifié.

Les flacons 4 et 5 servent de témoins.

On ajoute aux flacons 6, 8, 10 respectivement I, II et V gouttes d'ammoniaque du commerce ; aux flacons 7, 9 et 11, les mêmes doses sont distribuées sur des tampons de coton. Les flacons ensemencés sont portés à l'étuve.

Le lendemain, tandis que les témoins poussant sur le liquide de RAULIN montraient de beaux voiles qui donnèrent par la suite de belles cultures (pesant près de deux grammes à l'état sec), les témoins ensemencés sur le milieu modifié ne présentaient que de faibles voiles, diaphanes et peu consistants.

Les autres flacons étaient couverts de voiles semblables, mais plus épais. Ils se couvrirent plus tard de fructifications noires, bien formées, mais clairsemées et ne couvrant pas toute leur surface.

Les cultures furent recueillies le cinquième jour sur des filtres tarés, à cause de la difficulté que présentait leur récolte, puis séchées à l'étuve et pesées.

Pour voir si les fructifications obtenues n'avaient pas été altérées par l'ammoniaque, des spores furent recueillies sur quelques cultures, prises au hasard, et repiquées sur du liquide de RAULIN contenu dans des cuvettes en porcelaine classiques. Portées à l'étuve, elles donnèrent de belles cultures qui se couvrirent vers le troisième jour de fructifications noires abondantes.

L'ammoniaque n'exerce donc pas, à ces doses, d'action nocive sur la vitalité des cultures obtenues.

Nous fîmes un certain nombre d'expériences dans des conditions identiques, en restant dans les doses limites indiquées pour la première.

Nous avons réuni dans le même tableau des expériences faites dans des flacons (les six premières) et d'autres faites dans des cristallisoirs.

Les poids des cultures sont donnés en milligrammes.

N°	Durée	Témoins	Ammoniaque (gouttes)						
			dans le liquide			dans l'air ambiant			
			I	II	V	X	I	II	V
1	3	traces	40	33	26		34	28	27
2	3	15,16			20	14			49
3	3	68		92	85			424,409	90,96
4	2	25,21		25,24	24,25			24,26	24,27
5	3	28,29		30,28	30,32			28,37	29,30
6	3	traces		18,21	15,19			22,20	17,20
7	3	22		40,35				30,32	
8	3	40,20		73,83				67,65	
9	3	52,35			79,73				100,95
10	2	22,21			31,34				36,29
11	3	19,18			30,29				40,27
12	3	24,16			30,30				30,30

D'une manière générale, les poids des cultures sont très faibles, comme le laissent prévoir les essais préliminaires, dans lesquels l'on diminuait progressivement la proportion de sels ammoniacaux.

Mais il est curieux de constater que les cultures se couvrent malgré tout de fructifications noires, bien formées (à l'examen microscopique) et n'ayant pas perdu leurs facultés germinatrices, puisque, réensemencées sur du liquide de RAULIN complet, elles redonnent de belles cultures.

Enfin, et ceci est particulièrement net pour les dernières expériences (cristallisoirs), l'addition au milieu nutritif de faibles quantités d'ammoniaque provoque un sensible accroissement de poids des récoltes par rapport aux témoins (accroissement qui peut atteindre 50 %).

L'on constate les mêmes résultats quand on soumet les cultures à l'action des vapeurs alcalines dégagées par la solution ammoniacale.

Conclusions

Que l'on ait opéré sur du liquide de RAULIN normal ou que l'on ait utilisé un milieu privé de sels ammoniacaux, nous avons constaté que :

L'ammoniaque, aux faibles concentrations (1 pour 11.000 à 1 pour 3.000), favorise la croissance de l'*Aspergillus niger*. Pour des concentrations plus fortes, cette action favorisante se change en une action antiseptique, et lorsque la concentration dépasse 1 pour 2.000, l'on ne peut plus obtenir de culture.

Enfin, si au lieu d'ajouter l'ammoniaque au milieu de culture, on soumet celui-ci à l'action de gaz ammoniac que laisse dégager la solution du commerce, les effets obtenus se montrent sensiblement identiques.

Les résultats de ces expériences doivent être réglés par le Ph du milieu et son pouvoir tampon (vis-à-vis des doses variables d'ammoniaque ajoutées).

Une étude plus approfondie exigerait la détermination du Ph au moment de l'ensemencement et à divers stades du développement de la moisissure. Cette étude n'a pas été faite ici.

B. — Acétate d'ammoniaque

Puisque de faibles quantités d'ammoniaque exercent un effet excitant sur la croissance de l'*Aspergillus* poussant sur un milieu dépourvu d'azote, il nous parut intéressant de rechercher si un sel d'ammonium volatil et dissociable aurait un effet analogue.

Nous nous sommes adressés à l'acétate d'ammoniaque qui, dissous dans l'eau, constitue le soluté officinal d'acétate d'ammoniaque, renfermant 18,5 grammes pour cent de ce sel (Codex). L'on sait que cette solution, de saveur et de réactions légèrement alcalines, perd spontanément par dissociation à l'air libre du gaz ammoniac.

M. BACH (13) fit paraître en 1924 une étude intitulée : « Sur la toxicité et la valeur alimentaire de l'acétate d'ammoniaque pour les champignons inférieurs ». Cet auteur faisait pousser l'*Aspergillus repens* de Bary sur un milieu où la source d'azote est constituée par de l'acétate d'ammoniaque à la concentration N/10, et obtenait une culture rapide et vigoureuse. Le Ph qui était au début de 6,2 descend à 4,5 au quatorzième jour ; à ce moment, le sucre étant consommé, le mycélium s'attaque à la molécule acide et le milieu s'alcalinise jusqu'à 8,4 au vingt-deuxième jour. « Dans ces conditions, l'acétate d'ammoniaque doit être considéré comme un bon aliment. »

Mais si l'on additionne le milieu d'acide chlorhydrique, on n'obtient de culture que lorsque le Ph est supérieur à 5,2 ; les milieux plus acides renferment donc une substance toxique qui serait, d'après M. BACH, la portion d'acide acétique existant à l'état de molécule non dissociée. La toxicité des acides non dissociés dépend de la concentration de ces acides et du Ph.

Ces faits furent étendus par M. BACH aux formiate, propionate et butyrate d'ammoniaque.

Dans le cas présent, notre seul but fut d'étudier la valeur alimentaire de l'acétate d'ammoniaque pour l'*Aspergillus niger*, cultivé sur un milieu totalement privé de

sels d'ammonium, que l'on soumettait aux vapeurs dégagées par le soluté officinal d'acétate d'ammoniaque.

Comme précédemment, les expériences ont été faites en utilisant comme récipients des flacons et des cristallisoirs fermés, dans lesquels 100 centimètres cubes de liquide de culture ne renfermant pas de sels ammoniacaux, étaient ensemencés au moyen de spores d'*Aspergillus*.

Les doses d'acétate d'ammoniaque étaient réparties sur des tampons de coton suspendus à l'intérieur des vases au-dessus de la surface du milieu de culture. Chaque expérience comporte deux témoins.

Le tableau ci-dessous rassemble ces essais ; les quatre premiers ont été obtenus dans des flacons, les suivants dans des cristallisoirs.

Etant donnés les faibles poids obtenus et la difficulté de récolter les cultures, elles ont été recueillies sur des filtres tarés et pesées après dessiccation à l'étuve.

Leurs poids sont donnés en milligrammes.

N ^{os}	Durée	Témoins	Acétate d'ammoniaque (en gouttes)									
			I	II	V	X	XII	XV	XX	L	C	CL
1	4	17 - 26			47	50	48	47				
2	3	16 - 10		15	19	21			20			
				15	16	15			20	17		
3	4	26 - 28		45	52	50			52			
				38	48	49			41			
4	2	21 - 22								50		
										32	27	
										28	29	25
5	4	20 - 20			20	52						
6	3	9 - 8	18	20								
			20	21								
7	4	31 - 32	37	38								
			45	48								
8	2	21 - 19	23	26								
			30	34								

Comme dans le cas de l'ammoniaque, les cultures obtenues formaient des voiles peu consistants, blanchâtres, qui se couvraient de fructifications noires, peu abondantes, mais bien formées et capables de redonner de belles cultures, après repiquage sur du liquide de RAULIN.

A la lecture du tableau précédent, l'on constate que, dès la plus faible dose d'acétate d'ammoniaque, à laquelle les cultures furent exposées, l'on obtient un accroissement très sensible de la récolte.

Les récoltes les plus fortes ont été obtenues pour des doses comprises entre X et XX gouttes d'acétate. Avec les doses supérieures, il y a une légère diminution du poids des récoltes, mais elles restent encore plus fortes que les témoins.

Les vapeurs alcalines que dégage spontanément le soluté d'acétate d'ammoniaque constituent donc un bon aliment pour la croissance de l'*Aspergillus niger*, même à de fortes doses — ceci confirme les résultats obtenus par M. BACH en l'utilisant comme source d'azote — et, en aucun cas, contrairement à l'ammoniaque, l'on n'obtient un ralentissement des cultures.

**

Amines

Nous avons complété l'étude de l'action des composés azotés volatils sur la croissance de l'*Aspergillus* par l'essai de quelques amines grasses ou aromatiques.

Cette étude a déjà fait l'objet d'un travail important de M. L. LUTZ (16) « Recherches sur la nutrition des végétaux ».

Antérieurement G. VILLE avait remarqué que les végétaux peuvent assimiler les chlorhydrates de méthylamine et d'éthylamine.

PASTEUR (cité par RAULIN) avait observé la possibilité de nourrir les Mucédinées à l'aide d'éthylamine.

RAULIN a constaté que les sels d'aniline et de rosaniline ne permettent pas le développement de l'*Aspergillus niger*.

M. LUTZ fit ses expériences avec l'*Aspergillus niger* sur un milieu où l'azote minéral et ammoniacal était remplacé par de l'azote sous forme de combinaisons aminées ou alcaloïdiques. Les champignons ont assimilé directement l'azote provenant des amines les moins élevées en grandeur moléculaire aussi facilement que s'il s'était agi d'azote nitrique ou ammoniacal ; les amines phénoliques n'ont donné lieu à aucun développement de même que les sels d'ammonium composés et les alcaloïdes.

Le poids des champignons obtenus finalement était d'autant plus élevé que la grandeur moléculaire du radical substitué à l'hydrogène l'était moins.

Nous nous sommes adressés d'abord à la diméthylaniline, puis à la triméthylamine, et enfin à l'aniline.

Diméthylaniline. — C'est un liquide jaune clair, d'odeur forte et désagréable, peu volatil ($E = 191-192^\circ$) non miscible à l'eau et s'étalant à sa surface.

Nous avons étudié son action comparativement à des témoins, soit en l'ajoutant au milieu de culture, soit en la distribuant sur des tampons de coton, suspendus à l'intérieur des récipients (cristallisoirs dans la première ex-

périence, flacons dans les suivantes), contenant 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN.

Voici les résultats de ces essais :

DURÉE	TÉMOINS	I	II	V	X	I	II	V	X
3	0 gr. 955	1.087	0.993			0.970	1.090		
3	0 gr. 962		.	0.988				0.832	
2	0 gr. 613	0.680	0.718			0.634	0.714		
2	0 gr. 567		0.623	0.665	traces		0.672	0.573	0

C'est à peine si l'on peut noter une légère excitation pour les faibles doses ; en tous cas la diméthylaniline ne gêne pas les cultures.

A partir de X gouttes, elle a un effet antiseptique.

Triméthylamine. — C'est un liquide incolore, mobile, d'odeur ammoniacale désagréable et persistante, bouillant à plus 9°. Pour l'utiliser, nous avons fait une émulsion au dixième dans l'eau distillée, en opérant dans un vase entouré de glace. L'on répartissait cette émulsion sur des tampons de coton par multiples de X gouttes.

Au lieu de liquide de RAULIN, nous avons employé comme milieu de culture le liquide modifié qui nous a déjà servi. Nous n'avons fait que les trois expériences suivantes :

DURÉE	TÉMOINS	X	XV	XX	XXX	XL	LX	C
3	22,21,20	32,31		34,35		32,29		
3	27,24,23		32,30		34,31		25,26	
3	23,25	35		40	37	36		

La triméthylamine semble donc favoriser nettement la croissance de l'*Aspergillus* et présenter un maximum

pour la faible dose de II gouttes mises dans l'atmosphère des récipients. Pour la dose beaucoup plus forte de dix gouttes, elle empêche la culture.

Aniline. — Pour l'aniline, nous avons employé le liquide de culture privé de sels ammoniacaux.

DURÉE.	TÉMOINS	I	II	V	X	XX	L
4	25				23	20	
4	23,22				22	15	
3	34,31	26,27	24,28	31,31	30,25		
3	27,23	27	25	25	22		
4	18,19	19	21	24	23		

Il est facile de voir que l'*Aspergillus* est indifférent aux vapeurs d'aniline, du moins à de faibles doses ; cette amine aromatique est, du reste, peu volatile. Néanmoins les récoltes ont tendance à diminuer lorsque les doses d'aniline augmentent, en ne donnant plus que de faibles traces de culture, et il y a lieu de noter la coloration jaune de plus en plus accentuée que prend le liquide de culture au cours de ces expériences.

Vapeurs nitreuses. — Nous avons soumis des milieuxensemencés d'*Aspergillus* à l'action des vapeurs nitreuses.

Pour réaliser ces essais, l'on suspendait à l'intérieur des récipients clos des coupelles en porcelaine, contenant quelques gouttes d'une solution concentrée de nitrite de soude (à saturation ou à demi-saturation). L'on y versait au moyen d'une pipette, une ou plusieurs gouttes d'acide sulfurique pur ou dilué au dixième.

L'on avait ainsi des concentrations variables en vapeurs nitreuses, concentrations marquées par la coloration jaune plus ou moins intense des récipients dans lesquels on opérait.

Dans aucun cas, nous n'avons pu obtenir de culture ; les liquides restaient parfaitement limpides et, aussi fai-

bles que fussent les traces de vapeurs nitreuses, aucune trace de culture ne s'est montrée, même au bout de plusieurs jours.

**

Acide acétique

Nous savons que l'acétate d'ammoniaque constitue un bon aliment pour la croissance de l'*Aspergillus niger*; mais, si l'on acidifie le milieu, l'on n'obtient de culture qu'à partir d'un certain Ph. Les milieux acides renferment donc une substance toxique qui serait, d'après M. BACH, la portion d'acide acétique existant à l'état de molécule non dissociée.

Ces faits nous ont amenés à chercher quelle serait l'influence de doses croissantes d'acide acétique sur la croissance de la moisissure et nous avons étudié comparativement l'effet exercé par l'addition de l'acide dans le milieu de culture et l'effet des mêmes doses agissant à l'état de vapeurs.

Une première série d'expériences fut faite dans des flacons renfermant 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN, que l'on ensemençait avec une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Chaque essai comportait un témoin, des flacons dans le liquide desquels on ajoutait un nombre croissant de gouttes d'acide acétique et des flacons dans lesquels les doses respectives étaient réparties sur des tampons de coton surmontant le milieu de culture.

Le compte-goutte utilisé donnait LV gouttes au centimètre cube.

Nous donnons ci-dessous les concentrations correspondant aux diverses doses ajoutées :

	I goutte	II	IV	VI	X
	1	1	1	1	1
Concentrations :	$\frac{1}{5.550}$	$\frac{1}{2.750}$	$\frac{1}{1.375}$	$\frac{1}{916}$	$\frac{1}{550}$

Les résultats de ces essais figurent dans le premier tableau.

*
**

Dans la deuxième série d'expériences, l'on utilisa des cristallisoirs, renfermant 100 centimètres cubes de liquide de RAULIN,ensemencés.

Chaque essai comportait un témoin, trois récipients dans lesquels des doses d'acide croissantes étaient réparties sur des tampons, et un cinquième dans le liquide duquel l'on ajoutait la même dose d'acide que dans le quatrième.

(Cette disposition est la même que celle des derniers essais relatifs au formol.)

Les résultats figurent dans le deuxième tableau.

N ^{os}	Durée	Témoins	Acide acétique (gouttes)							
			dans le liquide				dans l'air			
			I	II	IV	VI	I	II	IV	VI
1	2	0,674	0,683	0,760		0,568	0,693	0,780	0,561	0,542
2	2	0,632	0,712	0,740	0,575	0,290	0,650	0,728	0,550	0,075
3	5	1,130	1,215	1,271	1,160	1,013	0,930	1,265	1,146	1,120
4	2	0,353	0,800	0,830	0,720	0,545	0,635	0,647	0,700	0,650
5	3	0,884	1,068	9,996	0,981	0,727	0,678	0,981	0,840	0,650
6	2	0,683	0,757	0,761	0,454	0,105	0,666	0,698	0,513	0,667
7	3	0,857	1,007	1,034	0,626	0,690	0,786	0,961	0,823	0,675
8	2	0,803			0,679				0,663	

N ^{os}	Durée	Témoins	Acide acétique			
			dans le liquide			dans l'air
			I	II	IV	IV
1	2	0,500	0,486	0,475	0,450	0,403
2	2	0,549	0,828	0,551	0,443	0,427
3	2	0,660	0,640	0,616	0,602	0,555
4	2	0,120	0,916	0,878	0,831	0,829
5	2	0,656	0,624	0,620	0,584	0,620
6	3	traces	0,834	0,834	0,751	0,637
7	2	0,533	0,538	0,507	0,421	0,433

A la lecture du premier tableau, il semble que : l'acide acétique, aux faibles concentrations (1/5.500 à 1/2.750) favorise légèrement la croissance de l'*Aspergillus*, et la concentration de 1/2.750 semble la plus favorable.

Pour les concentrations plus fortes, cette action, de favorisaute, devient légèrement antiseptique et ceci est net pour la teneur en acide de 1/900. Avec des concentrations de 1/550 nous n'avons pu obtenir de cultures.

Si nous comparons les effets des vapeurs d'acide acétique, avec ceux des mêmes doses d'acide ajoutées directement dans le milieu de culture, les résultats obtenus sont sensiblement du même ordre, néanmoins les poids de culture sont dans l'ensemble inférieurs, quand elles ont été soumises aux vapeurs d'acide.

Si maintenant nous examinons le deuxième tableau : dès la plus faible concentration en acide, les vapeurs se sont montrées antiseptiques par rapport aux témoins, et cet effet antiseptique va en croissant avec les doses d'acide.

Les résultats des deux tableaux semblent donc au premier abord contradictoires. Mais il faut tenir compte du fait que, dans le premier cas, les vapeurs d'acide se diffusent dans un volume d'air bien supérieur à celui qui leur est offert dans les cristallisoirs. Elles agissent donc à une plus grande dilution, pour laquelle elles favoriseraient les cultures. Dans le second cas, leur concentration est plus forte et elles exerceraient alors sur les cultures un effet antiseptique.

C. — Gaz de la décomposition organique

Historique :

L'on sait que la présence des microbes dans l'air a été démontrée dès le début de l'ère pastorienne par PASTEUR lui-même et différents auteurs.

Depuis CORNET et ses expériences sur la transmission de la tuberculose, on incriminait, pour expliquer la contagion par l'air, l'action des poussières sèches. Mais FLÜGGE (1), vers 1897, eut l'idée de la transmission des maladies par les poussières aqueuses. Au début du siècle, M. TRILLAT, s'appuyant sur les dernières acquisitions de la microbiologie, de la physique et de l'épidémiologie, reprit les recherches de FLÜGGE sur la transmission des maladies par l'intermédiaire des poussières aqueuses et développa une thèse fondée sur le rôle de l'humidité vésiculaire de l'atmosphère pour expliquer le mécanisme de la contagion.

En considérant les poussières aqueuses, non seulement comme des véhicules, mais encore comme des milieux plus ou moins favorables à la vitalité des germes, le même auteur introduisit la notion de supports microbiens actifs.

Enfin, avec la notion vérifiée expérimentalement de « gaz aliments », M. TRILLAT ne vit, dans le méphitisme de l'air qu'un gaz aliment, susceptible de se dissoudre dans la gouttelette microbienne pour influencer plus ou moins favorablement la vitalité et la virulence du germe.

Après avoir montré l'action des facteurs physiques sur le comportement des gouttelettes microbiennes de l'atmosphère, il étudia l'influence que pouvait avoir la composition chimique de l'air sur la vitalité des germes contenus dans ces gouttelettes. Au lieu d'envisager les miasmes, c'est-à-dire les atmosphères chargées d'émanations putrides, comme causes déterminantes des mala-

(1) Ces données ont été empruntées à la thèse du docteur Brullin (1) *Contribution à l'étude du mécanisme de la contagion par l'air et par l'eau.*

dies, il s'est demandé s'ils ne pouvaient pas constituer, par leur composition chimique, un milieu particulièrement favorable à la conservation et au développement des germes pathogènes.

Il vérifia son hypothèse expérimentalement ; par des essais nombreux et divers, il acquit la certitude qu'un air chargé d'émanations putrides favorise la vitalité des germes.

Il montra ensuite que le facteur favorisant des gaz est dû, pour partie à l'alcalinité du gaz et surtout au fait qu'il est un aliment pour le microbe.

L'étude expérimentale d'une série de substances volatiles alcalines (ammoniaque, amines grasses, etc...) a mis en évidence leurs propriétés conservatrices ou activantes vis-à-vis des germes.

Ainsi le gaz ammoniac, dilué dans l'air à la dose infinitésimale de 1/5.000.000 s'est montré un agent favorisant, mais à un degré moindre que les amines de la série grasse qui se produisent dans la décomposition organique (triméthylamine, amylamine). Le gaz ammoniac est également moins actif que certaines amines aromatiques ou dérivées de la série pyridique.

Aussi, pour une même alcalinité, le pouvoir favorisant d'un air purement ammoniacal est-il très inférieur à celui de l'air putride.



En tenant compte de ces données, et après avoir observé les effets de faibles doses de gaz ammoniac sur la croissance de l'*Aspergillus niger*, nous nous sommes demandés si l'on n'obtiendrait pas une activation de la culture, en la mettant au contact d'une atmosphère chargée de gaz putrides, comme ceux que dégagent, par exemple, les cultures du *Pseudomonas prodigiosa*.

EXPÉRIENCES

Les premiers essais, dans lesquels l'*Aspergillus* était cultivé sur le liquide de RAULIN, n'ont pas donné de résultats assez nombreux pour pouvoir être notés. Mais, par la suite, nous avons utilisé comme milieu de culture le liquide modifié ne renfermant pas de sels ammoniacaux, et nous avons obtenu des résultats intéressants.

Expériences 1 et 2 :

Les vases utilisés sont des flacons contenant 100 centimètres cubes de liquide modifié, ensemencés au moyen d'une émulsion de spores d'*Aspergillus*.

Les deux premiers servent de témoins.

Les quatre suivants reçoivent sur des tampons de coton une émulsion dans l'eau distillée (2 à 3 centimètres cubes) d'une culture de *Prodigiosus* sur gélose. Cette culture, vieille de trois mois, a peu d'odeur.

Les quatre derniers sont traités de même, mais la culture utilisée est récente (moins de huit jours) et dégage une odeur putride.

Les flacons sont portés à l'étuve à 35°.

Le développement des cultures s'est montré tout à fait semblable à celui des expériences faites avec l'ammoniaque. Les témoins présentaient de faibles voiles, les autres montraient des voiles plus épais, avec des fructifications plus abondantes et plus belles. Leur consistance rendant leur récolte difficile, elles furent recueillies le troisième jour sur des filtres tarés.

Après dessiccation, elles furent pesées ; les poids figurent avec ceux des expériences suivantes dans le tableau.

Expériences 3 et 4 :

Les deux premiers vases servent de témoins.

Sur les tampons de coton suspendus dans les deux suivants, l'on répartit également une émulsion aqueuse

de *Prodigiosus* (culture récente sur gélose en boîte de Pétri).

Les tampons des deux derniers flacons, au lieu de recevoir une émulsion de *Prodigiosus*, servent à recueillir directement cette culture par frottement à la surface d'une boîte de Pétri. L'on supprime dans ce cas l'intermédiaire de l'eau.

Comme nous le verrons à la lecture du tableau, les résultats furent les mêmes, quel que soit le mode de répartition de la culture de *Prodigiosus* (émulsion aqueuse ou prélèvement par frottement).

Expérience 5 :

Cette expérience et les suivantes furent faites dans des cristallisoirs renfermant 100 centimètres cubes de liquide modifié,ensemencés comme précédemment.

Les deux premiers sont témoins.

Les deux suivants sont munis de tampons sur lesquels l'on répartit une émulsion aqueuse d'une culture récente de *Prodigiosus* sur gélose Pétri. Dans les deux derniers, la culture est prélevée directement par frottement au moyen des tampons.

Les expériences 6, 7, 8 et 9 sont identiques.

Expérience 10 :

Celle-ci comporte deux témoins et sur les tampons des vases en expérience, l'on répartit une émulsion aqueuse de *Prodigiosus*.

Mais les témoins et les deux premiers ne sont pas fermés hermétiquement par les plaques de verre ; un intervalle d'environ un millimètre est réservé entre elles, et les bords des cristallisoirs au moyen de cavaliers placés à cheval sur ceux-ci. Les deux derniers vases sont, au contraire, soigneusement fermés.

Comme le montrent les résultats obtenus dans cet essai, les poids de culture obtenus ont été supérieurs, en laissant un faible accès à l'air libre.

Nous avons rassemblé ci-après ces expériences.

Les poids sont donnés en milligrammes.

N ^o	Durée	Témoins	Cultures soumises aux gaz putrides de Prodigiosus					
			récentes			anciennes		
1	3	25, 23	25	21	28	31	26	26
2	3	20, 13, 18					23	23
3	5	25, 24	39	38	36	10	22	25
4	4	24, 23	10	40				24
5	2	19, 19	36	32	32	45		
6	2	19, 16	29	28	32	37		
7	3	18, 19	29	30	28	32		
8	3	22, 22	32	41	32	36		
9	3	23, 22	37	37	30	33		
10	10	31, 32	45	46	55	57		

Expériences sous cloche :

Avant d'interpréter les résultats précédents, nous ajoutons ici ceux de trois expériences faites à la température du laboratoire (20° environ). Nous nous sommes servis de deux cloches d'une capacité de dix litres, sous chacune desquelles on disposait un certain nombre de cristallisoirs contenant 100 centimètres cubes de liquide modifié, et ensemencés d'*Aspergillus*.

Ceux de la première cloche servaient de témoins.

Sous la deuxième, on pulvérisait à diverses reprises, au moyen d'un fin pulvérisateur, une émulsion de *Prodigiosus* dans l'eau distillée, en s'arrangeant de façon à ce que les jets soient dirigés vers le centre de la cloche. On arrêtait les pulvérisations lorsque l'atmosphère de la cloche était trouble. La même opération était recommencée le lendemain et le surlendemain.

Les cristallisoirs étaient abandonnés à la température du laboratoire et les cultures furent recueillies au bout de temps compris entre huit et dix jours sur des filtres tarés.

Après dessiccation, elles donnèrent les poids suivants, exprimés en milligrammes :

	TÉMOINS	VASES EN EXPÉRIENCE
Première expérience	19, 17, 16	27, 25, 28
Deuxième expérience	17, 14, 14	29, 33, 32
Troisième expérience	14, 20, 15, 16	38, 37, 36, 39

Quelles conclusions peut-on tirer des résultats précédents ?

Il est visible, et ceci est particulièrement net pour les dernières expériences sous cloche, que si l'on expose une culture d'*Aspergillus* à une atmosphère chargée des émanations putrides dégagées par une culture de *Prodigiosus*, l'on obtient un accroissement sensible de poids des récoltes (pouvant atteindre 50 %).

Nous nous sommes demandés si, parmi ces substances volatiles d'odeur désagréable, il n'y aurait pas lieu de

noter, outre celle d'amines, la présence de gaz ammoniac.

Pour nous en assurer, l'essai suivant fut réalisé :

Des flacons bouchés, renfermant du bouillon de bœuf stérile furentensemencés de *Prodigosus* et portés à l'étuve. En suspension dans chacun d'eux se trouvait un tampon de coton volumineux, imbibé d'eau, destiné à absorber une partie des gaz putrides dégagés. Les cultures se développèrent rapidement.

A des intervalles de vingt-quatre heures, les tampons étaient recueillis, exprimés dans des tubes à essai stériles, et rincés avec deux ou trois centimètres cubes d'eau distillée. L'on recherchait alors l'ammoniaque par le réactif de NESSLER. Sa présence fut décelée dès le lendemain de l'ensemencement par une coloration jaune, qui s'accrut les jours suivants et atteignit son maximum (coloration brun noir) vers le quatrième jour.

Nous utilisâmes aussi une deuxième réaction due à M. TRILLAT. L'on ajoute II ou III gouttes d'une solution d'iodure de potassium à 5 % au liquide ammoniacal, puis I goutte d'eau de Javel concentrée ; il se forme une coloration brune due à la formation d'iodure d'azote. Cette réaction, bien que moins fidèle que la précédente, fut positive.

Nota. — Le même essai fut fait en mettant I goutte d'ammoniaque commerciale dans un flacon bouché tenant en suspension un coton humide ; deux jours après la recherche de l'ammoniaque dans l'eau de lavage du coton, fut positive.

Il y a donc lieu de signaler la présence de gaz ammoniac parmi les gaz d'odeur putride que dégagent les cultures de *Prodigosus*. Mais il est probable que sa présence seule ne peut suffire à expliquer leur action excitante sur la croissance de l'*Aspergillus*, et une part doit être accordée à d'autres substances volatiles, parmi lesquelles des amines.

RESUME DES ESSAIS ET CONCLUSIONS GENERALES

Résumé des essais :

A) Nous avons cherché, au cours des expériences variées que nous avons exposées dans ce travail, si la composition chimique de l'air avait une influence sur le développement des cultures de moisissures et nous avons pris comme exemple l'*Aspergillus niger* à cause de sa culture facile, de sa grande sensibilité aux réactifs et parce que l'on peut mesurer leurs effets par les poids des récoltes obtenues.

L'action antiseptique de certaines substances vis-à-vis des moisissures était déjà connue et avait pu être évaluée. On a également signalé l'action antiseptique des vapeurs d'aldéhyde formique, mais sans donner de précisions au sujet des moisissures. Dans nos essais, nous avons tenté de combler cette lacune.

Nous avons surtout cherché à montrer, en prenant comme exemple le formol, que l'action antiseptique à l'état de vapeurs était plus énergique que lorsqu'on introduisait l'antiseptique dans le terrain de culture ; c'est là un des points capitaux de notre travail.

Nous avons expliqué pour une part le mécanisme de cette action et donné les raisons pour lesquelles les mêmes doses d'antiseptique étaient plus actives à l'état de vapeurs et nous avons montré les applications pratiques que l'on peut en tirer pour la conservation de certains liquides fermentescibles, au moyen d'une technique simple. Les expériences montrent que, pour la conservation de liquides fermentescibles que l'on a souvent à utiliser dans la pratique, il est commode d'employer la méthode aérienne.

Parmi les autres antiseptiques étudiés, le chloroforme a un effet moins marqué, notamment sur la diminution des poids des cultures, mais son action a pour effet de retarder la croissance de la moisissure jusqu'à deux et trois jours.

Quant aux vapeurs d'essences aromatiques, leurs effets diffèrent suivant leur nature. Si celles de girofle et de cannelle, bien que provoquant une légère diminution de poids des récoltes, n'ont qu'une action faible, il n'en est pas de même des essences de thym et d'amandes amères qui, à de très faibles doses, empêchent totalement la croissance.

B) La deuxième partie de cette étude a mis en évidence que certaines substances favorisent la croissance de la moisissure et donnent une augmentation du poids des récoltes.

Il en est ainsi pour l'ammoniaque, mais, seules, de faibles doses se montrent favorisantes, car au delà d'un certain taux, l'ammoniaque cesse d'être un aliment pour devenir toxique. Cette action peut être attribuée à un changement du degré d'alcalinité du milieu et de l'air.

Les vapeurs alcalines que dégage la solution d'acétate d'ammoniaque se sont montrées nettement favorisantes dans tous les cas.

Parmi les amines, il semble que seules les amines grasses favorisent la croissance, les amines aromatiques semblant gêner les cultures.

Quant à l'acide acétique, il favorise d'abord légèrement les cultures, puis assez rapidement exerce une action antiseptique.

Enfin, il est intéressant de noter que nous avons pu obtenir une augmentation de poids des récoltes en faisant pousser l'*Aspergillus niger* sur un milieu privé d'azote, en le soumettant simplement aux émanations putrides dégagées par l'un des bacilles de la décomposition organique, le *Prodigiosus*, émanations qui renferment sans doute, outre de faibles quantités d'ammoniaque, d'autres substances volatiles azotées qui sont des produits de désintégration de la cellule vivante.

Dans ce cas, on peut invoquer spécialement le rôle de l'alimentation gazeuse.

C) Enfin, si l'on compare l'action des vapeurs avec celle des mêmes doses d'une substance antiseptique ou

favorisante ajoutée directement dans le milieu de culture, nous avons constaté que :

Dans le cas du formol, les vapeurs de cette aldéhyde se sont montrées beaucoup plus antiseptiques que les mêmes doses de solution mises en œuvre.

Dans le cas de l'ammoniaque, les vapeurs sont aussi actives que la solution, et leurs effets suivent une marche parallèle.

Conclusions générales

Ce travail est forcément incomplet comme nous l'avons fait observer au début de cette étude.

Il en est cependant ressorti quelques résultats bien nets qui permettent d'établir une analogie, lointaine il est vrai, mais bien admissible, avec ce qui se passe dans la nature.

Nous avons pu, en modifiant simplement la composition de l'air, sans rien changer au milieu de culture, gêner et empêcher ou, au contraire, favoriser la croissance de l'*Aspergillus niger*.

L'ensemble de nos expériences fait entrevoir l'influence que peuvent avoir les plus faibles variations de la composition chimique de l'air atmosphérique sur la marche de la végétation.

Et, connaissant le fait que des doses infimes d'émanations puissent agir sur des microbes, phénomène qui est de l'ordre de grandeur et des doses et des microorganismes, il n'y a rien d'étonnant à ce que des doses infinitésimales de substances répandues dans l'air aient pu exercer une action antiseptique ou favorisante sur la végétation de la moisissure.

Vu : *Le Doyen,*

P. GUÉRIN.

Vu : *Le Président de Thèse,*

E. TASSILLY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- (1) J. RAULIN : Etudes chimiques de la végétation, 1870.
- (2) LOEW : Physiologische Notizen über Formaldehyd. *Münchener Medicinische Wochenschrift*, 1888, p. 412.
- (3) H. BLÜCHNER et M. LEGALL : Über antiseptische Wirkungen des Chloroform, Formaldehyd und 'Creolin. *Münch. Medic. Woch.* 1889, p. 341.
- (4) A. TRILLAT : Sur les propriétés antiseptiques de la formaldéhyde. *Journ. Pharm. Ch.* 1892-xxvi, p. 134.
- (5) BERLIOZ et TRILLAT : Sur les propriétés des vapeurs de formol. *J. P. C.* 1892-xxvi, p. 419.
- (6) TRILLAT : Propriétés antiseptiques des vapeurs de formol. *J. P. C.* 1894-xxx, p. 498.
- (7) VAN ERMINGEN et SUGG : *Archives de Pharmacodynamie de Gand*, t. I^{er}, fasc. 2 et 3, 1894.
- (8) TRILLAT : Sur le formol, *J. P. C.* 1894-xxx, p. 537.
- (9) G. TIRABOSCHI : *Policlinico* (section pratique), 1908, p. 27.
- (10) F. G. GUSTAFSON : Etudes comparatives sur la respiration. *Journ. of general physiology*, I, nov. 1918, p. 181-192.
- (11) K. BERNHAUER : Beiträge zur Enzymchemie der durch *Aspergillus niger* bewirkten Säurebildungs vorgänge. *Zeitschrift für physiologische Chemie* 1928, 177, p. 90.
- (12) D^r FORNÉ : Contribution à l'étude des essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques. *J. P. C.* 1893-xxviii, p. 318.
- (13) MIQUEL (P.) et CAMBIER (R.) : *Traité de bactériologie pure et appliquée à la médecine et à l'hygiène*. Paris, C. Naud, 1902.
- (14) D. BACH : Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. Influence de la réaction du milieu. Saint-Dizier, 1925.
- (15) D. BACH : Sur la toxicité et la valeur alimentaire de l'acétate d'ammoniaque pour les champignons inférieurs. *C. R. Ac. Sc.* 1924, 179, N° 20, p. 1085.
- (17) D^r BRULIN : Contribution à l'étude du mécanisme de la contagion par l'air et par l'eau.
- (16) L. LÜTZ : Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique (amines, sels d'ammonium composés et alcaloïdes). Paris, Masson, 1898.

